



*Instituto de Neurociencias
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Universidad Miguel Hernández*

La ruta de señalización de la reelina y su alteración en la enfermedad de Alzheimer

*Memoria para optar al grado de Doctor
presentada por:*

Valeria Roxana Balmaceda Valdez

Directores:

Dr. Javier Sáez Valero

Dra. Inmaculada Cuchillo Ibáñez

Sant Joan d' Alacant, 2014

Don **Juan Lerma Gómez**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Director del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto CSIC-UMH,

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “La ruta de señalización de la reelina y su alteración en la enfermedad de Alzheimer”, ha sido realizada por Dña. Valeria Roxana Balmaceda Valdez, Licenciada en Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Javier Sáez Valero y la Dra. Inmaculada Cuchillo Ibáñez y da su conformidad para que se presente el borrador de tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expide y firma el presente Certificado en San Juan de Alicante a 7 de Marzo de 2014.

Fdo.: Juan Lerma Gómez

El Dr. **Javier Sáez Valero**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández (UMH) e Investigador adscrito al Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto UMH-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y la Dra. **Inmaculada Cuchillo Ibáñez**, Investigadora CIBERNED.

CERTIFICAN

Que Dña. Valeria Roxana Balmaceda Valdez, Licenciada en Biología Molecular, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge en su Tesis Doctoral “La ruta de señalización de la reelina y su alteración en la enfermedad de Alzheimer”.

Que ha revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo y da su conformidad para que se presente el borrador de tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden y firman el presente Certificado en San Juan de Alicante 7 de marzo de 2014.

Fdo.: Javier Sáez Valero

Fdo.: Inmaculada Cuchillo Ibáñez

Yo no podría haber alcanzado este objetivo si no hubiera contando con la disposición y la ayuda de mucha gente. Por ello, me doy el gusto de agradecer a las personas que pusieron sus valiosos e incontables granos de arena durante estos años de trabajo. Así que, comienzo:

Quisiera agradecer al Dr. Javier Sáez Valero por la oportunidad que me ha ofrecido de trabajar en su grupo de investigación. Agradezco enormemente su constante soporte y las discusiones “open mind” que tanto he degustado y que, junto a la libertad que he tenido durante mis estudios de doctorado, me han hecho disfrutar plenamente de la ciencia.

Agradezco también a mi co-directora, la Dra. Inmaculada Cuchillo Ibáñez, por la gran ayuda y dedicación que he recibido de su parte, por su estímulo y su apoyo profesional, porque han sido realmente valiosos para mi crecimiento.

A las chicas del laboratorio: MaríaLetizia, Trini Maciá, Trini Mata, Carol, Salu y Llorens. Trabajar junto a ellas ha sido excelente! Gracias por el aguante, los hermosos recuerdos y las buenas enseñanzas.

Quisiera agradecer a muchos de los grupos de investigación del Instituto de Neurociencias, a los que tantas veces he concurrido “en busca de”. En particular, agradezco a los Dres. Joan Galcerán, José Manuel Mingot y Luis Miguel Valor por su gran disposición y asistencia.

Agradezco la increíble ayuda que he recibido de Francesco con la compaginación de la tesis. ¡Tu curiosidad me ha salvado!.

A los chicos: Guillermo, Enoch, Javier, Antonello, Rebeca, Abraham y Carlos, por esos momentos libre de pipetas y sencillamente geniales.

Y a Francesco, gracias una y otra y mil veces, por estar presente, ¡Siempre!!



*“Todas las teorías son legítimas
y ninguna tiene importancia.*

*Lo que importa es
lo que se hace con ellas.”*

Jorge L. Borges.

INDICE

1. Lista de ABREVIATURAS	- 1 -
2. RESUMEN	- 5 -
3. INTRODUCCIÓN	- 9 -
CAPÍTULO 1: La enfermedad de Alzheimer	- 9 -
1.1. Neuropatología	- 10 -
1.1.1. Ovillos neurofibrilares	- 10 -
1.1.2. Placas amiloides	- 12 -
1.1.2.1. Las secretasas	- 13 -
1.1.2.2. El procesamiento proteolítico del APP: formación del péptido A β	- 16 -
CAPÍTULO 2: Desarrollo de la enfermedad de Alzheimer	- 21 -
2.1. La enfermedad de Alzheimer: Causas	- 21 -
2.1.1. Alzheimer esporádico	- 21 -
2.1.2. Alzheimer Familiar y mutaciones asociadas	- 22 -
2.2. Hipótesis de la cascada amiloide	- 23 -
2.3. Diagnóstico	- 25 -
CAPÍTULO 3: La reelina y sus receptores	- 29 -
3.1. La reelina en el cerebro adulto	- 29 -
3.2. El gen de reelina y su producto proteico.	- 30 -
3.3. El procesamiento proteolítico de reelina	- 33 -
CAPÍTULO 4: La reelina y su cascada de señalización	- 35 -
4.1. Los receptores de la reelina	- 35 -
4.1.1. Los receptores de la reelina y su procesamiento proteolítico	- 37 -
4.1.1.1. El procesamiento por las metaloproteasas y la generación de fragmentos solubles extracelulares	- 38 -
4.1.1.2. La γ -secretasa y la generación del fragmento intracelular	- 38 -
4.2. Reelina y su señalización celular	- 40 -

CAPÍTULO 5: La reelina y la enfermedad de Alzheimer	- 45 -
5.1. Función de la reelina en la plasticidad sináptica en adultos	- 45 -
5.2. La reelina y su vínculo con la enfermedad de Alzheimer	- 46 -
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 51 -
5. RESULTADOS	- 55 -
OBJETIVO 1. “La reelina anormalmente glicosilada presenta alteraciones en su función biológica”:	- 55 -
OBJETIVO 2. “El procesamiento del receptor de la reelina, ApoER2, mediado por la γ -secretasa está implicado en la expresión de la propia reelina”	- 69 -
ANEXO. “Los niveles del fragmento soluble del receptor de reelina ApoER2 están disminuidos en LCR de pacientes con Alzheimer”	- 83 -
6. DISCUSIÓN	- 89 -
7. CONCLUSIONES	- 99 -
8. APÉNDICE	- 103 -
9. BIBLIOGRAFÍA	- 109 -

1. Lista de ABREVIATURAS

A β : péptido β amiloide (del inglés Amyloid- β)

ADAM: metaloproteasas y desintegrinas (del inglés A Desintegrin And Metalloproteinases)

ADN: Acido DesoxirriboNucleico

AICD: dominio Intracelular de APP (del inglés APP Intra Citoplasmic Domain)

AKT: proteína quinasa B (ó PKB)

ApoE: Apolipoproteína E

ApoER2: receptor tipo 2 de apolipoproteína (del inglés: Apolipoprotein E Receptor type 2)

APP: Proteína Precursora Amiloide (del inglés Amyloid Precursor Protein)

ARNm: Acido RiboNucleico mensajero

BACE: enzima de ruptura del sitio β de APP (del inglés Beta-site APP Cleaving Enzyme)

CAMKII: Calcio Calmodulina proteína quinasa II

cdk5: quinasa dependiente de ciclina 5 (del inglés Cyclin Dependent Kinase 5)

crk: quinasa relacionada a Cdc. (del inglés Cdc-Related Kinase)

CTF: fragmento carboxilo terminal (del inglés : C Terminal Fragment)

Dab 1: (del inglés Disabled type 1)

Dominio PTB: Dominio de unión a fosfo tirosinas (del inglés Phospho Tyrosin Binding domain)

EA: Enfermedad de Alzheimer

EGF: factor de crecimiento epidérmico (del inglés Epidermic Grow Factor)

FDG-PET: tomografía por emisión de positrones con Fluorodesoxiglucosa (del inglés FluoroDeoxyGlucose-PET)

GSK-3 β : Glucógeno sintetasa quinasa 3 β (del inglés Glycogen Synthase Kinase-3 β)

ICD: fragmento intracelular. (del inglés Interacellular Cytoplasmatic Domain)

kDa: kilo Daltons

LDLr: receptor de: lipoproteína de baja densidad (del inglés Low Density Lipoprotein receptor)

LCR: Líquido CéfaloRaquideo

Lrp8: receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado con la proteína 8 (del inglés: Low density lipoprotein receptor related to protein 8)

LIS1: complejo Lisencefalia tipo 1

LTP: Potenciación a largo plazo (del inglés Long-Term-Potentiation)

MAP: proteína asociada a microtúbulos (del inglés Microtubule Associated Protein)

MAP 1: proteína asociada a microtúbulos tipo 1

MAP 2:proteína asociada a microtúbulos tipo 2

MRN: resonancia magnética cerebral (del inglés Magnetic Resonance Neurography)

NMDAr: receptor de *N*-metil *D*-aspartato (del inglés N-Methyl-D-Aspartate receptor)

p53: Proteína supresora de tumores 53

PET: tomografía por emisión de positrones (del inglés Positron Emission Tomography)

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa (del inglés PhosphoInositide 3-Kinase)

PKA: quinasa de la proteína A (del inglés Protein Kinase A)

PKB: proteína quinasa B (ó AKT) (del inglés Protein Kynase B)

PP-1: fosfoproteína fosfatasa1 (del inglés Protein Phosphatase 1)

PP-2A: fosfoproteína fosfatasa 2A (del inglés Protein Phosphatase 2A)

PSEN(1-2): gen de la Presenilina (tipo 1 y 2)

PSD-95: proteína de densidad post-sináptica 95 (del inglés PostSynaptic Density protein 95)

sAPP: APP soluble (del inglés soluble Amyloid Precursor Protein)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico. (del *inglés* Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

SFK: familia de tirosina quinasas Src (del inglés Src Family of tyrosine Kinases)

SNC: Sistema Nervioso Central

SP: Espondina (del inglés Spondin)

TACE: enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α (del inglés TNF -Alpha Converting Enzyme)

TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés Tumoral Necrosis Factor)

tPA: Activador de plasminógeno tisular (del inglés tissue Plasminogen Activator)

VLDLr: receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés Very Low Density Lipoprotein receptor)

2. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que clínicamente está caracterizada por un deterioro progresivo de la memoria y de las habilidades cognitivas. Patológicamente, la enfermedad se caracteriza por la presencia de placas seniles a nivel extracelular y ovillos neurofibrilares intracelulares. Los componentes de dichas lesiones, el péptido amiloide A β , por parte de las placas, y la proteína citoesquelética tau anormalmente fosforilada, en los ovillos, aparecen como los efectores neurotóxicos que conducen a la pérdida progresiva de sinapsis y neuronas.

En el cerebro adulto, los procesos involucrados en la formación de la memoria a largo plazo (LTP) y la plasticidad sináptica están regulados por la glicoproteína reelina. Una vez secretada, reelina interacciona con sus receptores ApoER2 y VLDLR, y activa una ruta de señalización intracelular que determina la fosforilación de diversas quinasas, entre las cuales se encuentra, GSK-3 β la principal quinasa que interviene en la fosforilación de tau. En modelos transgénicos se ha demostrado que la falta de expresión de la reelina promueve la fosforilación de tau. Diversos estudios en humanos también sugieren que bajos niveles de reelina se relacionan con la aparición de enfermedades mentales, pudiendo participar en el desarrollo de disfunciones cognitivas moderadas y severas.

Nuestro grupo de trabajo es pionero en el estudio de la reelina en la enfermedad de Alzheimer. El análisis de esta glicoproteína en extractos de cerebro humano de sujetos con Alzheimer, demuestra niveles elevados de reelina tanto de proteína como de transcrito, respecto al de sujetos sin patología. Ensayos *in vitro* en líneas celulares tratadas con el péptido A β , junto a estudios realizados con modelos de animales transgénicos de Alzheimer con sobreexpresión amiloide, han permitido demostrar que la presencia de niveles elevados de A β promueve un incremento en los niveles de reelina. Resulta igualmente relevante que la reelina expresada en cultivos

tratados con A β presenta una glicosilación alterada, de manera semejante a las glicoformas de reelina caracterizadas en el cerebro de sujetos con la EA.

Los trabajos de investigación que se recopilan y dan lugar a esta Tesis Doctoral se centran en el estudio de la reelina en cerebros de individuos afectados por la EA. En estos trabajos, nuestro interés ha sido determinar si la reelina presente en el cerebro humano con Alzheimer es biológicamente activa. Empleando modelos celulares en presencia del péptido A β hemos producido glicoformas anómalas de la reelina que han resultado ser ineficaces en formar dímeros de la proteína, forma activa en la que se une a receptores y activa la ruta de señalización. De este modo, la afinidad de unión de glicoformas de reelina, expresadas en presencia de A β , por su receptor ApoER2 también se ve disminuida; lo que induce fallos en la traducción de la señal, afectando al estado de fosforilación de tau. Correlacionamos estas alteraciones de reelina, observados *in vitro*, a los caracterizados en el cerebro de sujetos con EA, en donde además de una glicosilación anómala, la reelina se asocia en formas oligoméricas distintas de los dímeros activos que están presentes en condiciones no patológicas.

Ha sido también de nuestro interés investigar si el receptor ApoER2 está involucrado en la regulación de la vía de señalización de reelina, a través de su propio procesamiento. Se conocía ya que tras la unión a reelina y la activación de su cascada el receptor ApoER2 es procesado secuencialmente por actividades α -secretasa y γ -secretasa. El último corte generado por γ -secretasa libera un fragmento soluble intracelular de ApoER2. Nuestra investigación nos ha permitido avanzar en la caracterización de éste fragmento intracelular de ApoER2 y demostramos que se acumula en la región nuclear, donde modula la actividad del promotor de la reelina, disminuyendo los niveles de expresión de esta proteína.

En una condición patológica, como la descrita en cerebros de sujetos de Alzheimer, donde la reelina interacciona de manera ineficaz con su receptor, es de esperar una menor generación de fragmentos del receptor ApoER2, que conllevaría una menor represión del promotor de la reelina. Esta situación promovería el mantenimiento de unos niveles de reelina altos. Aún

queda por determinar por qué esta nueva reelina, expresada en un ambiente de elevada presencia de A β , como en corteza de EA, presenta una glicosilación anómala y resulta biológicamente ineficaz en el desempeño de su función.



3. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), descrita por Alois Alzheimer en 1907, es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva, siendo la principal causa de demencia en personas ancianas, con una prevalencia del 50-60% sobre el resto de las neuropatologías y con una incidencia que aumenta exponencialmente con la edad (*Blennow y col, 2006*). A causa de las consecuencias tanto epidemiológicas como económicas asociadas a ésta neuropatología, la EA tiene un gran impacto en la sociedad (*Hampel y col, 2011*).

La principal característica de la enfermedad de EA es una pérdida progresiva de la memoria. Al comienzo de la enfermedad, el paciente muestra incapacidad para realizar las actividades cotidianas, así como dificultades para escribir y hablar, desorientación espacial y una marcada reducción en la capacidad para resolver problemas. Estas deficiencias se van acentuando con el progreso de la patología. Normalmente la muerte sobreviene por complicaciones secundarias a la enfermedad y al debilitamiento que conlleva, como neumonía, embolia pulmonar o sepsis (*Steele y col, 1990*).

La sintomatología que acompaña a la EA se deriva del deterioro de la neurotransmisión sináptica en diferentes áreas del sistema nervioso central (SNC) (*Selkoe, 1989*). El proceso neurodegenerativo daña en gran medida todo el cerebro, aunque las regiones cerebrales específicamente afectadas son el neocortex, el área entorrinal, el hipocampo, los núcleos amigdalinos, el núcleo basal de Meynert, el tálamo anterior y los núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico (*locus coeruleus* y complejo del rafe). Resulta evidente la atrofia cerebral de personas con EA con un rango de edad semejante. En ellos se observa una pérdida de la masa cerebral de cerca del 2-3% anual, comparado con el 0.4-0.5% observado en personas ancianas sanas (*Karas y col, 2004*).

1.1. Neuropatología

Histológicamente, en el cerebro de una persona con Alzheimer se pueden encontrar dos tipos de lesiones características: los ovillos neurofibrilares intraneuronales y los depósitos de placas amiloides (también denominadas neuríticas o seniles) presentes en regiones extraneuronales (*Figura 1*). Durante décadas se ha interpretado que las alteraciones del citoesqueleto celular y de las sinapsis, provocadas por estas lesiones, son la principal causa de la progresiva muerte neuronal observada en el SNC de personas con la EA.

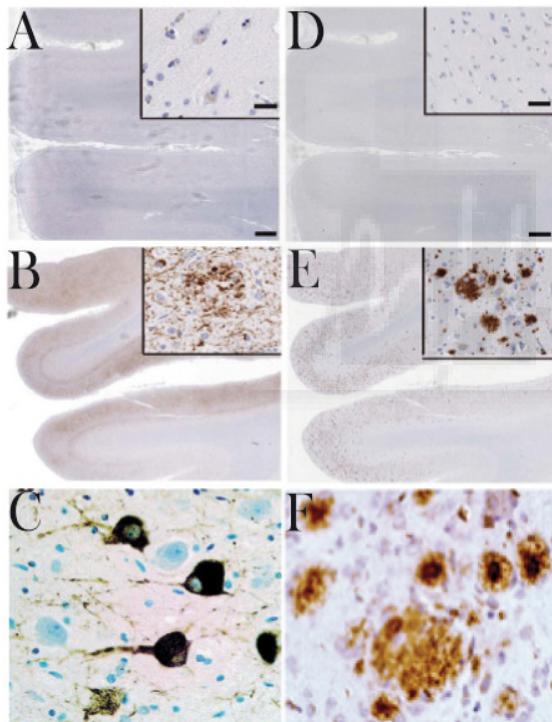


Figura 1.

Secciones de corteza prefrontal de sujetos adultos control (**A y D**) y con la enfermedad de Alzheimer (**B y C, E y F**) (se muestra un caso de 75 años). La tinción de la proteína tau fosforilada (**A, B, C**) y de péptidos β -amiloide (**D, E, F**) permite observar las lesiones características de la EA: los ovillos neurofibrilares intraneuronales (**B y C**) y la acumulación de placas amiloides (**E y F**); mientras que en los sujetos controles (**A y D**) estas lesiones están ausentes (un caso de la misma edad que el Alzheimer). Los recuadros muestran mayor magnificación con especial énfasis sobre las placas y ovillos (escala 60 μm). Escala de las figuras A-E: 600 μm ; C y F: 10 μm . Adaptación de *Moore y col, 2012*.

1.1.1. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares son inclusiones intracelulares constituidas por filamentos, los cuales están formados principalmente por la proteína citoesquelética tau (*Ávila, 2000; Iqbal y col, 2005*) (*Figura 1B y 1C*). Tau es

una proteína axonal que se asocia a microtúbulos del citoesqueleto (MAP), promoviendo el ensamblaje de la tubulina y estabilizando la estructura de los de los microtúbulos (*Figura 2*) mediante sus estados de fosforilación (*Lovestone y Reynolds, 1997; Hartigan y Johnson, 1998; Cuchillo y col, 2008*). El estado de fosforilación de tau es el resultado del balance entre las actividades de diferentes quinasas y fosfatasas. Dentro de la amplia cantidad de quinasas que fosforilan a tau, GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa-3 β) y cdk5 (quinasa dependiente de ciclina 5) son las principales que actúan en el SNC, y ambas están asociadas con los estados de hiperfosforilación de tau observados en la EA (*Pei y col, 1998; 1999*).

La desfosforilación de tau esta modulada por proteínas con actividad fosfatasas, encontrándose principalmente las fosfatasas PP-1 y PP-2A. En cerebros con la EA también se ha detectado una disminución de la actividad de estas fosfatasas (*Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008; Khatoon y col, 1994*). La fosforilación anormal de tau no sólo la incapacita para unirse a tubulina y promover la formación de microtúbulos, sino que además inhibe el ensamblaje y desestabiliza a los microtúbulos presentes (*Figura 2 C*). En neuronas cerebrales de personas con la EA cerca del 40% de la proteína tau anormalmente fosforilada está presente en el citosol, sin polimerizar y formando ovillos neurofilamentosos (*Figuras 1(B-C) y 2 (D-E)*) (*Kopke y col, 1993*). Esta propiedad tóxica también involucra el secuestro de la proteína tau normal por parte de la proteína anómala, junto con el secuestro de otras proteínas asociadas a microtúbulos neuronales como MAP1 y MAP 2 (*Alonso y col, 1996; 1997*).

La presencia de ovillos neurofibrilares afecta al transporte axonal y por tanto a la funcionalidad sináptica y la viabilidad celular. Los ovillos neurofibrilares no son exclusivos de la EA, también pueden encontrarse en otros tipos de demencia como la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal y alguna otra, que junto a la EA constituyen un grupo de patologías conocidas todas ellas como taupatías (*Hernández y Avila, 2007*). Solo en la EA estas lesiones coexisten con las placas amiloides.

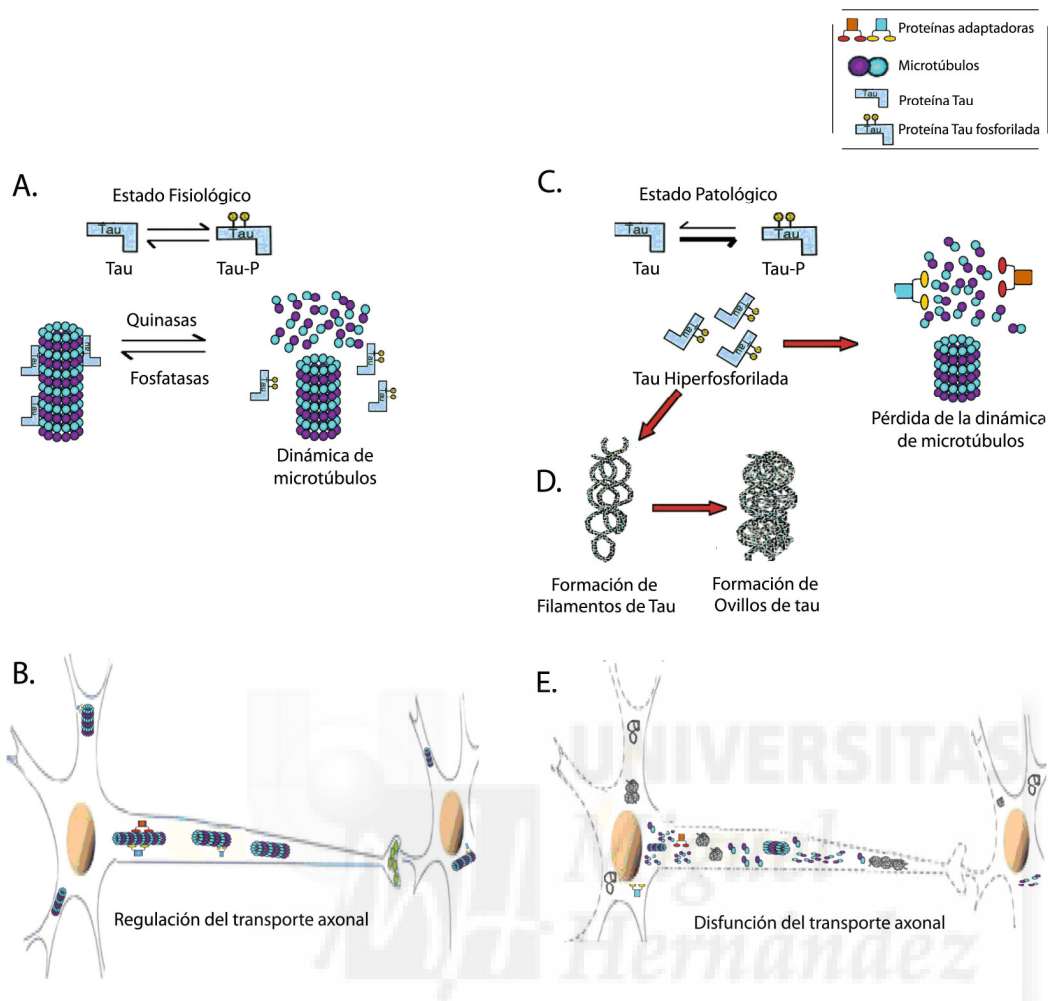


Figura 2. En condiciones fisiológicas, tau presenta un equilibrio entre sus formas fosforiladas y desfosforiladas (A), que permite el ensamblaje y la estabilización de microtúbulos, facilitando el transporte axonal (B). En condiciones patológicas, existe un desequilibrio en las actividades quinasa/fosfatasa, que lleva a la forma de tau hiperfosforilada (C). Tau hiperfosforilada tiene la capacidad de formar fibras, que se agregan generando ovillos intracelulares neurotóxicos (D) y como consecuencia, se pierde el ensamblaje de microtúbulos afectando a la actividad neuronal (E). Figura adaptada de Johnson y Stoothoff, 2004

1.1.2. Placas amiloides

Otro tipo de lesiones que aparecen en los cerebros de los afectados por la enfermedad son las placas amiloides (*Figura 1E y 1F*). Estas lesiones son depósitos de péptidos amiloides, en cuya cercanía se concentran axones y dendritas distróficas, así como astrocitos y microglía activada.

El péptido amiloide ($A\beta$) es el producto del corte proteolítico que sufre la proteína precursora del amiloide (APP), una proteína de transmembrana del tipo I con un largo dominio extracelular y que presenta expresión ubicua.

El gen del APP está localizado en humanos en el cromosoma 21, siendo objeto de procesamiento alternativo. En cerebro se pueden encontrar sus tres variantes que van de los 695 aminoácidos (la más corta y abundante en neuronas) a los 751 y 770 aminoácidos (*Nalivaeva y Turner, 2013*).

En el SNC el APP está implicado en la regulación del crecimiento de neuritas durante el desarrollo (*Herns y col, 2004*), mientras que en cerebro adulto está involucrado en procesos de adhesión celular, neuroprotección y formación de la sinapsis, y es capaz de modular la transcripción de varios genes (*Raychaudhuri y Mukhopadhyay, 2007*). Se han identificado varias proteínas que interactúan con el APP y que regularían su procesamiento y la señalización intracelular. Por estas razones se considera que el APP podría actuar como un receptor de la superficie celular (*Zheng y Koo, 2011*).

No obstante, una característica del APP es su breve periodo de permanencia en la membrana plasmática, ya que es rápidamente procesado. Su procesamiento está regulado por la acción de enzimas del tipo proteasas, las llamadas α - y β -secretasa, que actúan alternativamente produciendo largos fragmentos solubles. El fragmento resultante, todavía anclado a membrana, será procesado a continuación por la γ -secretasa generándose fragmentos más cortos tanto a nivel extracelular, que incluyen al péptido $A\beta$, como intracelular. La mayoría de estos fragmentos solubles presentan actividad biológica, como veremos a continuación.

1.1.2.1. Las secretasas

α -secretasa: La actividad α -secretasa se ha identificado en diversas proteasas del tipo desintegrinas y metaloproteasas (llamadas ADAMs) y constituyen una gran familia de las cuales ADAM10 y ADAM17 (también llamada TACE) son las que predominan en neuronas (*Vingtdeux y*

Marambaud, 2012). Las enzimas con actividad α -secretasa son mayoritariamente proteínas integrales de membrana, aunque también pueden existir isoformas solubles (*Zolkiewska, 2008*). La α -secretasa actúa sobre una gran variedad de sustratos además del APP; como la familia de receptores EGF y Notch, entre otros (*Zhang y col, 2012*). Su procesamiento genera un ectodominio soluble, que en el caso de APP se denomina fragmento soluble α o simplemente *sAPP α* .

β -secretasa: También llamada BACE1. Es una proteína de transmembrana de tipo I con actividad aspartil proteasa. Presenta su sitio activo en el lado luminal de la membrana plasmática. El procesamiento del APP inducido por BACE1 genera como producto un fragmento soluble llamado *sAPP β* (*Marcinkiewicz y Seidah, 2000*). Debido a que la β -secretasa está implicada en la generación del péptido A β (ver la sección 1.1.2.2) su modulación se investiga activamente como estrategia terapéutica en la EA (*Ghosh y col, 2012*).

La BACE1 se encuentra altamente expresada en el SNC, principalmente en las neuronas. Una deficiencia de BACE1 en modelos animales parece vincularse con anomalías en la función sináptica, lo que sugiere que esta secretasa juega un papel importante en la función del SNC. Varios sustratos de la BACE1 están implicados en funciones sinápticas, como las efrinas y las semaforinas, entre otras (*Savonenko y col, 2008, Wang y col, 2008*).

γ -secretasa: La γ -secretasa es un complejo enzimático de cuatro proteínas integrales de membrana (*Wakabayashi y De Strooper, 2008*). El complejo γ -secretasa presenta, además del APP, más de 90 sustratos identificados hasta la fecha (*Haapasalo y Kovacs, 2011; Lleó y Saura, 2011*). Sus sustratos son siempre proteínas de transmembrana de tipo I que han sufrido un corte previo por α - o β -secretasas. Los sustratos de γ -secretasa no presentan una secuencia específica, sino requerimientos muy vagos, un ectodominio corto (menor de 300 aminoácidos), y una región intracelular relativamente corta, siendo en el dominio de transmembrana donde se produce el corte. Como resultado del procesamiento por la γ -secretasa se

liberan fragmentos proteicos biológicamente funcionales, tanto en el lado luminal como el lado citoplasmático de la membrana. La diversidad de sus sustratos pone en evidencia la importancia biológica de la γ -secretasa tanto en etapas de desarrollo como también en la vida adulta.

En el caso de APP, el corte por la γ -secretasa libera péptidos solubles extracelulares, incluyendo el péptido A β (en la ruta denominada amiloidogénica), así como fragmentos citoplasmáticos (llamados AICD) (*Figura 4*).

Las cuatro subunidades que constituyen el complejo de la γ -secretasa son indispensables para su actividad biológica (*Figura 3*), y se presentan en una estequiometría 1:1:1:1 (*Sato y col, 2007; Zhang y col, 2012; De Strooper y col, 2012*).

Estos componentes son:

➤ *Las Presenilinas*: Constituyen el centro catalítico del complejo γ -secretasa, existiendo dos homólogos en mamíferos (PS1 y PS2), que no coexisten en el mismo complejo. Las mutaciones genéticas sobre las presenilinas están involucradas con la variante familiar de la enfermedad de Alzheimer, como se discutirá en el próximo capítulo.

Las presenilinas son proteínas de multipaso con 9 dominios de transmembrana. Durante su maduración, PS1 y PS2 son procesadas generando, de manera semejante para ambas presenilinas, un fragmento N terminal y C terminal. Esta endoproteólisis es fundamental para su función, porque una vez que la proteína está anclada en la membrana, ambos fragmentos forman la unidad catalítica con actividad aspartil-proteasa.

➤ *Nicastrina* es una glicoproteína de tipo I. Durante su maduración, la nicastrina cambia de conformación e interactúa con presenilina, lo que permite el ensamblaje, la maduración y la actividad del complejo γ -secretasa.

➤ *Aph-1* presenta dos homólogos en humanos, Aph-1a y Aph-1b, que no coexisten en el mismo complejo. Aph-1 interactúa con la nicastrina inmadura

y con la presenilina. Al parecer, Aph-1 inicia el ensamblaje del complejo en el retículo endoplasmático, actuando como una proteína de andamiaje.

➤ *Pen-2* promueve la maduración del complejo γ -secretasa. Interactúa con la presenilina y promueve de este modo la endoproteólisis de la presenilina activándola.

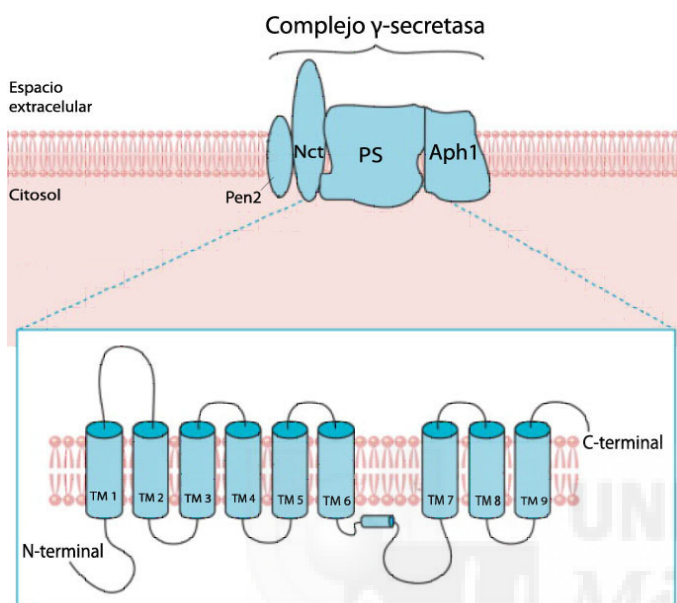


Figura 3. El complejo γ -secretasa lleva a cabo el procesamiento de proteínas de transmembrana del tipo I. El complejo está formado por Aph1, presenilina (PS; ya sea tipo 1 o 2), nicastrina (Nct) y Pen2, con una estequiometría 1:1:1:1. Presenilina es una proteína de multipaso (recuadro) y es la unidad funcional del complejo, posee una actividad aspartil-proteasa. Las mutaciones sobre las presenilinas están asociadas con la EA familiar. Estas influyen en el procesamiento del APP afectando las cantidades relativas de $A\beta_{1-42}$ / $A\beta_{1-40}$ (Figura adaptada de Bergmans y De Strooper, 2010).

Como se comentó, el complejo γ -secretasa actúa sobre sus sustratos sin necesidad de una secuencia consenso de corte. Esta selectividad laxa probablemente le permite procesar a sus sustratos a distintos niveles generando péptidos de diferentes tamaños (Wakabayashi y De Strooper, 2008).

1.1.2.2. El procesamiento proteolítico del APP: formación del péptido $A\beta$

El procesamiento del APP presenta dos rutas alternativas de procesamiento que comienzan con la acción ya sea de la α -secretasa o de la β -secretasa, y ambas culminan con la acción de la γ -secretasa (Figura 4 A-B).

La ruta no amiloidogénica (Figura 4 A) se inicia con el procesamiento del APP por la α -secretasa. Su corte genera una larga proteína soluble denominada sAPP α y un fragmento carboxilo terminal de APP, llamado C83, que permanece anclado a la membrana. A continuación, la γ -secretasa corta el fragmento transmembrana C83 produciendo un pequeño fragmento soluble llamado p3, de corta vida media y al que no se le conoce función biológica, y un fragmento citoplasmático llamado dominio intra-citoplasmático del APP (AICD), el cual actúa como regulador transcripcional de genes tales como la quinasa GSK-3 β , p53, entre otros (Von Rotz y col, 2004; Kimberly y col, 2001).

En la ruta amiloidogénica (Figura 4 B) el procesamiento del APP comienza con el corte generado por la β -secretasa y, de manera semejante a la ruta no amiloidogénica, produce un largo fragmento soluble conocido como sAPP β (algo más pequeño que sAPP α), mientras que el fragmento carboxilo terminal que permanece anclado a la membrana, es llamado en este caso C99.

El procesamiento de C99 por la γ -secretasa produce el fragmento intracelular AICD junto al péptido soluble extracelular A β . Aún queda por aclarar si los fragmentos AICD generados por una vía u otra presentan actividades reguladoras diferentes.

Por tanto únicamente la ruta amiloidogénica, con la acción sucesiva de la β - y la γ -secretasa genera el péptido A β . Debido a que la γ -secretasa presenta un corte poco específico, como se comentó en la sección previa, se pueden encontrar en la naturaleza péptidos A β de diferentes longitudes (Weidemann y col, 2002;). La mayor parte de los péptidos A β circulantes tienen una longitud de 40 aminoácidos y en menor proporción co-existen formas de 42 y 43 aminoácidos (A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₄₃ respectivamente), encontrándose también aunque en menor cantidad, péptidos A β circulantes de 38, 39 e incluso de 46 y 49 aminoácidos (Takami y col, 2009). Además, mediante espectrometría de masas se han identificado gran número de fragmentos truncados de A β (Portelius y col, 2010).

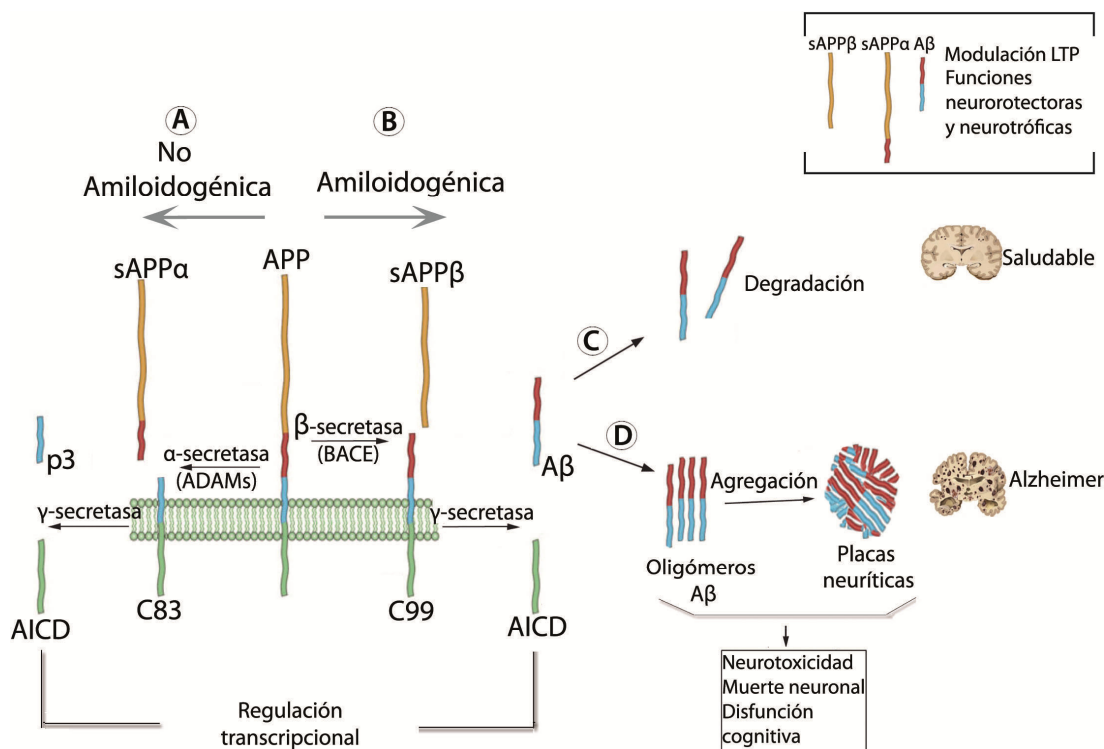


Figura 4. Rutas de procesamiento del APP. Mediante la ruta no amiloidogénica (A), el APP es procesado por las secretasas α - y γ -. El corte de la α -secretasa y la γ -secretasa generan fragmentos solubles extracelulares, el sAPP α y el fragmento p38 respectivamente. En la ruta amiloidogénica (B) el APP es procesado secuencialmente por las secretasas β - y γ -. El corte del APP mediado por la β -secretasa genera el fragmento soluble sAPP β y posteriormente el corte por la γ -secretasa libera el péptido A β . En condiciones fisiológicas normales (C), los niveles del péptido A β están modulados por procesos de degradación. En condiciones patológicas (D), las isoformas A β_{1-42} promoverían fibrilación generando oligómeros solubles, los cuales finalmente se agregarían formando las placas amiloides presentes en el cerebro con la enfermedad de Alzheimer. Los fragmentos solubles sAPP α y sAPP β están involucrados en la regulación de procesos cognitivos y de protección neuronal. En ambas rutas, la acción de la γ -secretasa genera un fragmento intracelular AICD el cual actúa como regulador transcripcional. Imagen modificada de Thathiah y De Strooper, 2011.

De las isoformas de A β identificadas, A β_{1-42} es la que presenta mayor toxicidad y propiedades fibrogénicas (Burdick y col, 1992; Younkin, 1995), y al parecer es capaz de inducir un cambio en el plegamiento de otras especies de A β (Jarrett y col, 1993). Así, estos péptidos A β con una conformación alterada son propensos a agregarse en oligómeros solubles (Figura 4 D), que van desde simples dímeros y trímeros a grandes oligómeros solubles, algunas veces referidos como *Ligandos Difusos Derivados de Amiloide*. Los oligómeros acaban por formar largas fibras insolubles que se acumulan generando las placas amiloides (Figura 1E y 1F)

(Scheuner y col, 1993; Borchek y col, 1996). Sin embargo, en la actualidad se conoce que son los agregados solubles los que resultan ser altamente tóxicos para las neuronas y alteran la sinapsis. En modelos murinos el exceso de A β soluble disminuye el número de las sinapsis y altera el aprendizaje (Durakoglugil y col, 2009). No obstante, no todo el daño asociado al amiloide necesariamente se debería a la excesiva acumulación de estos agregados soluble de A β , ya que también se ha documentado en neuronas acumulación intracelular de péptidos A β , probablemente consecuencia de endocitosis del A β o bien por endocitosis del APP desde la superficie celular, y posterior procesamiento en el interior de endosomas y/o lisosomas (Haass y col, 2012). En este último caso, los productos del procesamiento pueden re-secretarse o reternerse intracelularmente. La acumulación de agregados de A β intracelulares *in vitro* interrumpen la estructura de las neuronas, alteran la sinapsis y afectan el transporte axonal (Pigino y col, 2009; Tam y Pasternak, 2012). Se ha observado que incluso la acumulación de oligómeros intracelulares puede provocar la ruptura de los lisosomas llevando a la muerte neuronal (Tam y Pasternak, 2012). Este conjunto de eventos, podrían contribuir al progreso de la enfermedad

Si bien una producción elevada de A β produciría efectos neurotóxicos, en condiciones no patológicas el péptido A β se genera de forma constitutiva durante el metabolismo celular, encontrándose dicho péptido como una especie circulante en plasma y en el líquido cefalorraquídeo (LCR), tanto en humanos sanos como en otros mamíferos (Haass y col, 1992; Seubert y col, 1992). En condiciones fisiológicas (Figura 4 C), los niveles de A β del cerebro están regulados por procesos de degradación enzimática, donde participan la peptidasa degradadora de insulina, la neprilisina y otros miembros de su familia (Carson y Turner, 2002); estas enzimas también determinan la cantidad del péptido A β que atraviesa la barrera hematoencefálica (Tanzi y col, 2004). No se descarta que fallos en los mecanismos de degradación/eliminación del péptido A β también puedan contribuir al desarrollo del Alzheimer.

En condiciones no patológicas niveles adecuados de A β regularían distintas funciones celulares, e incluso oligómeros de A β_{1-40} y A β_{1-42} a bajas concentraciones podrían presentar efectos neurotróficos (*Yankner y col, 1990*), lo que corrobora que su papel funcional, y que sólo en exceso se asocia a eventos de neurotoxicidad.



CAPÍTULO 2: Desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

2.1. *La enfermedad de Alzheimer: Causas*

Es bien conocido que la edad es el factor de riesgo más importante para la enfermedad. Sin embargo, existen otros factores que pueden influir, como el estilo de vida, las lesiones cerebrales y otros asociados a la obesidad, diabetes y enfermedades vasculares (hipercolesterolemia, hipertensión, arteriosclerosis, enfermedades coronarias, entre otras) (Mayeux, 2003; Mortimer y col, 2003). También existen factores de riesgo asociado a la carga genética, en la que se determinadas variantes alélicas y polimorfismos se asocian a la probabilidad de desarrollar Alzheimer esporádico. Aunque en su mayoría (más de un 95%) la EA se corresponde a la variante esporádica, se conocen mutaciones autosómicas dominantes en tres genes, el APP, la PS1 y la PS2, que determinan una forma hereditaria del Alzheimer de aparición precoz y curso rápido que se denomina *EA familiar*. Aunque la EA familiar es una entidad distinta de la esporádica que requiere distintas estrategias de intervención, la identificación de los genes asociados a la misma ha permitido clarificar algunos mecanismos que están implicados en la EA esporádica.

2.1.1. *Alzheimer esporádico*

La forma de Alzheimer más común es la que surge de manera esporádica y suele expresarse en edades avanzadas, esto es, por encima de los 65 años. En el Alzheimer esporádico existe un patrón complejo donde los factores de riesgo genéticos contribuyen conjuntamente con los factores ambientales, por lo que resulta mucho más dificultoso identificar los locus relacionados con el Alzheimer esporádico. En 1993, dos grupos independientes reportaron una asociación entre el gen de apolipoproteína E (ApoE) y la EA (Corder y col, 1993; Poirier y col, 1993). ApoE es la proteína vinculada al metabolismo y transporte de lípidos en el SNC. En condiciones

patológicas el ApoE puede participar en los procesos de fibrilación de A β , asociándose con la formación de placas neuríticas (*Holtzman y col, 2000*). El gen *APOE* está situado en humanos en el cromosoma 19 y codifica para tres variantes alélicas o isoformas proteicas: Apo ϵ 2, Apo ϵ 3 y Apo ϵ 4. Diversos estudios han mostrado que la presencia del alelo ϵ 4 aumenta el riesgo de padecer la EA, siendo este tres veces más alto en heterocigotos y 15 veces más en homocigotos, en comparación con personas que no portan este alelo (*Strittmatter y col, 1993; Corder y col, 1993*). Si bien se han detectado más genes relacionados con el riesgo de padecer la EA (*Tanzi, 2012*; véase también AlzGene: <http://www.alzgene.org/TopResults.asp>), no se ha identificado ningún otro que contribuya de forma tan directa al desarrollo de la EA como el gen *APOE*.

2.1.2. Alzheimer Familiar y mutaciones asociadas

Los precedentes familiares pueden determinar la aparición de la EA del tipo familiar, presentando una herencia del tipo autosómico dominante y manifestándose a edades tempranas, esto es, antes de los 60 años (es conveniente aclarar que no todas las “formas tempranas” de la enfermedad se deben a causas genéticas). Desde el punto de vista genético las mutaciones que están implicadas en el desarrollo de la EA familiar están asociadas siempre a la formación de oligómeros de A β (*Campion y col, 1999*).

Los estudios sobre la trisomía 21 permitieron establecer el vínculo entre la disposición genética y la patología de Alzheimer, ya que las personas con síndrome de Down desarrollan neuropatologías que resultan indistinguibles de la EA entre la cuarta y quinta década de sus vidas (*Mann y col, 1984; Wisniewski y col, 1985*). En la década de los 80, se descubrió que el gen de la proteína APP está localizado en el cromosoma 21 (*Goate y col, 1991*), y que un aumento en la dosis génica debida a la trisomía está acompañado de un incremento en los niveles proteicos de APP que favorecería la mayor producción de A β , el desarrollo y el depósito de las placas neuríticas a

edades tempranas, como se observa en personas con el síndrome de Down (Mann, 1988; Tanzi y col, 1987).

Una gran parte de las mutaciones identificadas sobre el gen del APP están implicadas en las formas familiares de la EA, y se heredan de una manera autosómica dominante. Algunas de estas mutaciones se concentran alrededor del sitio de corte de secretasas, lo que posiblemente provoca una alteración en su procesamiento (Chávez-Gutiérrez y col, 2012); mientras que otras se ubican en la región central del péptido A β , y favorecen la generación de agregados insolubles (Brouwers y col, 2008).

No obstante la mayoría de las mutaciones asociadas a la EA no se corresponden a mutaciones en el gen del APP, sino a mutaciones sobre los genes de la PS1 (*PSEN*, en humanos en el cromosoma 14), así como en su homólogo PS2 (*PSEN2*, localizado en el cromosoma 1). Las mutaciones descritas, ya sea de ganancia como de pérdida de función de presenilinas, están implicadas en la producción desequilibrada del péptido A β ₁₋₄₂ (De Strooper, 2007; Wolfe, 2007).

A pesar de que es BACE la enzima que determina el procesamiento del APP mediante la vía amiloidogénica, no se conocen mutaciones asociadas a esta proteasa que estén implicadas con el desarrollo de la EA.

2.2. Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide intenta explicar el origen de la EA y sostiene que los eventos neuropatológicos de la enfermedad se inician por la acumulación del péptido A β ocasionado por un aumento de su producción y/o una disminución de su degradación. En consecuencia, estos péptidos se agregan y desencadenan el deterioro neuronal que conducen a la enfermedad (Hardy y Higgins, 1992; Hardy y Selkoe, 2002).

Como se ha comentado, las principales evidencias que apoyan esta hipótesis provienen de estudios de mutaciones genéticas asociadas a la EA

familiar, en donde la elevada producción del péptido A β esta asociada a las mutaciones de los genes APP o presenilinas. Por lo tanto, la acumulación de A β en el cerebro favorecería su oligomerización, que a su vez induce una cascada de efectos patológicos tales como microgliosis, astrocitosis, respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y déficit en la neurotransmisión, llevando a la muerte celular.

A pesar de que los ovillos neurofilamentosos son posiblemente el factor que mejor correlaciona con las carencias cognitivas asociadas a la EA, las mutaciones existentes sobre el gen de la proteína tau no se vinculan con la EA. Aún más, las mutaciones sobre éste gen causan enfermedades neurodegenerativas con ausencia de placas amiloides tales como la demencia frontotemporal. Sin embargo, la aparición de ovillos neurofibrilares tras tratamiento con A β en modelos murinos apoya la hipótesis de que la patología de tau en la EA sería una consecuencia de la sobreproducción de A β y de su toxicidad (*Ballatore y col, 2007, Van Swieten y Spillantini, 2007*). No obstante, la influencia que tiene el metabolismo anormal amiloide sobre la formación de ovillos de neurofilamentos es una cuestión que aún queda por resolver.

Como se comentaba en el capítulo anterior, en un principio se ha pensado que las placas neuríticas extracelulares eran las especies patogénicas de la enfermedad, actualmente se reconoce que son los oligómeros solubles de A β los verdaderos agentes tóxicos que comprometen la normal actividad neuronal (*Varvel, 2008; Shankar y col, 2008*).

Aunque la hipótesis de la cascada amiloide tiene muchos puntos discutibles, sigue siendo un modelo ampliamente estudiado tanto para la comprensión de la patología como para el desarrollo de terapias clínicas adecuadas que permitan mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad.

2.3. Diagnóstico

A pesar de que los síntomas clínicos son diagnosticados en personas adultas en un estado tardío, la neuropatología de la EA comienza varias décadas antes de su evidencia clínica (*Figura 5*) (*Hampel y col, 2011*). De este modo se estima que la neurodegeneración puede llegar a iniciarse 20 años antes del diagnóstico clínico.

Los biomarcadores establecidos hasta la fecha y mayormente consensuados se refieren a la determinación de los niveles de las proteínas A β y tau presentes en LCR. Se han encontrado niveles aumentados de tau y sus formas fosforiladas (P-tau) acompañados con bajas concentraciones de la forma neurotóxica de A β (A β_{1-42}) (*Tapiola y col, 2009; Fragan y col, 2007*).



Figura 5. El esquema representa cómo se distribuirían las placas y ovillos en diferentes estadios de la enfermedad: En un estadio preclínico, los marcadores neuropatológicos comenzarían a acumularse en regiones cerebrales vinculadas a la memoria y a procesos de pensamiento y planificación. Del estadio preclínico al clínico pueden pasar de 10 a 20 años, según la severidad de la patología. En este estadio, las placas se distribuirían hacia las regiones cerebrales vinculadas al habla, el entendimiento y la percepción espacial. Finalmente, en un estadio avanzado, los marcadores neuropatológicos se distribuirían por varias regiones cerebrales, con una abundante muerte neuronal y una dramática reducción del volumen cerebral. Imagen obtenida de *Alzheimer's Association®*.

La presencia de bajos niveles de A β_{1-42} en LCR probablemente se deba a que, a pesar de su elevada producción en cerebro, el péptido soluble es progresivamente secuestrado por la formación de placas neuríticas cerebrales. Así, la rápida fibrilación podría ser la causa de los niveles

menores de $A\beta_{1-42}$ en el LCR. No obstante, la medida de estas proteínas, tau/P-tau y $A\beta_{1-42}$, en LCR no proporciona suficiente especificidad y sensibilidad para realizar un diagnóstico temprano de la EA, antes de que se establezca la neurodegeneración (*Blennow y col, 2012*). La falta de marcadores tempranos limita el desarrollo de un tratamiento efectivo para la enfermedad. Actualmente, el diagnóstico definitivo de la EA se realiza *post mortem* tras la detección de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral.

Los estudios funcionales de imagen también ofrecen interés diagnóstico. Los análisis realizados por neuroimagen muestran que las medidas volumétricas del cerebro mediante Imagen de Resonancia Magnética (MRI) presentan reducciones en EA respecto a las mismas regiones estimadas en controles sanos; así como descensos en el metabolismo de glucosa cerebral observado mediante tomografía por emisión de positrones (PET) (*Frisoni y Blennow, 2013*).

Con la expectativa de lograr un diagnóstico temprano de la enfermedad actualmente se intenta realizar una evaluación conjunta de varios parámetros como:

- Los niveles de $A\beta_{1-42}$ en el LCR
- La relación existente entre los niveles de $A\beta$ en LCR y la presencia de las placas neuríticas en regiones cerebrales examinadas por PET
- Los niveles de tau total y P-tau en LCR
- El metabolismo cerebral usando FDG-PET
- La observación de la atrofia cerebral evaluada con MRI
- La integridad cognitiva, mediante pruebas psicoanalíticas

La combinación de biomarcadores presentes en el LCR junto con los análisis estructurales y funcionales del cerebro, podrían incrementar un diagnóstico temprano de la EA, lo que permitiría un tratamiento adecuado. Si bien

existen una gran cantidad de estudios acerca de nuevos biomarcadores, estos requieren ser evaluados clínicamente para probar su especificidad (*Blennow y col, 2012; Frisoni y Blennow, 2013*).



CAPÍTULO 3: La reelina y sus receptores

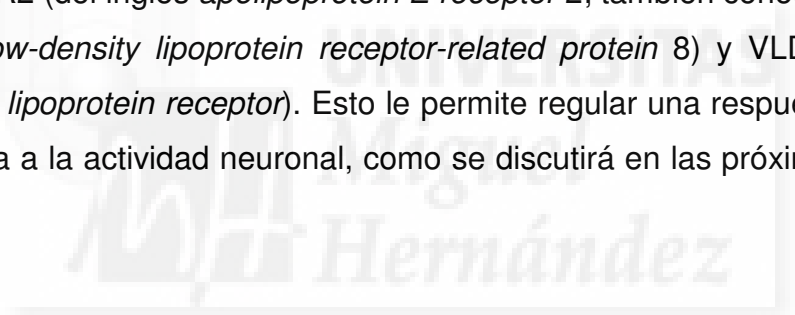
La reelina es una molécula de secreción que está presente en el SNC de todos los vertebrados y su expresión sigue un patrón altamente conservado (*Tissir y Goffinet, 2003*). También se expresa en tejidos periféricos como hígado, riñón y médula espinal, y se ha detectado además en el suero y en el LCR (*Ikeda y Terashima, 1997; Smalhieser y col, 2000; Sáez-Valero y col, 2003*). En el SNC, la reelina ejerce una importante función en la migración neuronal durante el desarrollo embrionario del cerebro, siendo fundamental para el desarrollo organizado de circuitos neuronales (*Apéndice*). En ratones, la mutación en el gen de la reelina ocurre de manera espontánea y recibe el nombre de mutación *reeler*. Estos ratones presentan severas alteraciones en la laminación de regiones estratificadas celularmente como la neocorteza, hipocampo y cerebelo. En modelos murinos, si se realizan mutaciones en los receptores de la reelina o en las moléculas implicadas en su señalización, como el adaptador intracelular *disabled 1* (*Dab1*), se replican fenotipos similares al *reeler*, y reciben el nombre de mutaciones *tipo reeler* (*Apéndice*). En humanos, las mutaciones sobre el gen de la reelina causan la lisencefalia con hipoplasia cerebral. Los individuos con ésta patología presentan escasos o nulos niveles de la reelina, lo que afecta a la migración neuronal y lo que conduce a serias alteraciones en la formación de estructuras laminadas del cerebro (*Apéndice*).

3.1. La reelina en el cerebro adulto

En roedores y primates adultos, la reelina se encuentra altamente expresada en el hipocampo y en la corteza entorrinal (*Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002*). Tanto el hipocampo como la corteza entorrinal la reelina y su vía de señalización está involucrada en sistemas explícitos de memoria (*Qiu y Weeber, 2007*), estando estas áreas cerebrales especialmente afectadas en la EA.

En el cerebro adulto de ratón, se ha observado que la reelina puede regular la distribución de las neuronas que se producen en el hipocampo, y además favorecer la conectividad neuronal induciendo y manteniendo la plasticidad sináptica (*Pujadas y col, 2010*). Las alteraciones sobre la vía de señalización de reelina están asociadas a desordenes neuropsiquiátricos tales como autismo, esquizofrenia, desorden bipolar, depresión mayor o enfermedad de Alzheimer, entre otras; en donde se han caracterizado niveles anormales de reelina que se asocian a deficiencias en la regulación de procesos cognitivos (*Folson y Fatemi, 2013*).

En corteza e hipocampo la reelina es secretada por las interneuronas GABAérgicas, y en el cerebelo por las células granulares glutamatérgicas (*Ikeda y Terashima, 1997; Pesold y col, 1998; Groc y col 2007*). La reelina secretada se localiza en las regiones sinápticas donde se une a sus receptores ApoER2 (del inglés *apolipoprotein E receptor 2*; también conocido como *LRP8* o *low-density lipoprotein receptor-related protein 8*) y VLDLR (*very low density lipoprotein receptor*). Esto le permite regular una respuesta celular que afecta a la actividad neuronal, como se discutirá en las próximas secciones.



3.2. El gen de reelina y su producto proteico.

El gen de la reelina fue descubierto durante el análisis genético del ratón *reeler* que permitió la clonación y el comienzo del estudio de su producto proteico (*D'Arcangelo y col, 1995; Hirotsume y col, 1995*). La proteína reelina, con 3461 aminoácidos, está sujeta a modificaciones postraduccionales basadas en *N* y *O* glicosilaciones, y el producto final es una proteína altamente glicosilada con un peso molecular relativo de 420 kDa (*D'Arcangelo y col, 1995; Hirotsume y col, 1995*). Una vez secretada, la reelina es capaz de formar homodímeros mediante enlaces covalentes, tanto *in vivo* como *in vitro*. Con ésta forma dimérica la reelina interactúa con sus receptores, induciendo la cascada de señalización celular de manera

eficiente (*D'Arcangelo y col, 1999; Utsunomiya-Tate y col, 2000; Strasser y col, 2004*).

El extremo N terminal de la proteína está altamente glicosilado y cuenta con un epítipo de importante función biológica, identificado como CR-50 (llamado así por el anticuerpo que reconoce y bloquea esta región) (*D'Arcangelo y col, 1997*). La glicosilación es un proceso celular específico, y las alteraciones de este mecanismo pueden comprometer la función de la reelina (*Cuchillo-Ibáñez y col, 2013*), como se discutirá en esta tesis. La presencia del epítipo CR-50 favorece la formación de los dímeros funcionales (*Utsunomiya-Tate y col, 2000*) (*Figura 6*). Además, el bloqueo de la región N terminal con un anticuerpo dirigido al epítipo CR-50 es capaz de neutralizar la actividad de reelina tanto *in vivo* como *in vitro* (*Del Rio y col, 1997; Miyata y col, 1997; Nakajima y col, 1997*). Los fragmento de reelina que carecen del epítipo CR-50, no forman dímeros estables *in vitro* y disminuye su eficacia para disparar su señalización, a pesar de que sea posible la unión a su receptor. Probablemente esta región N terminal favorece las interacciones electrostáticas necesarias para la formación tanto de dímeros como de otro tipo de oligómeros observados *in vitro* (*Utsunomiya-Tate y col, 2000; Kubo y col, 2002*).

El extremo N terminal también comparte un 25% de homología con la proteína de matriz extracelular F-espondina (dominio denominado SP). Al parecer, la presencia del dominio SP favorece la interacción de la reelina con integrinas, lo que se asocia con el crecimiento de neuritas (*Dulabon y col, 2000*).

La secuencia central de la reelina presenta ocho repeticiones (R), cada una de ellas de 350-390 aminoácidos (*D'Arcangelo y col, 1995; Ichihara y col, 2001*). Cada repetición está compuesta de dos sub-repeticiones A y B separadas por un dominio similar a EGF en la región central (“*EGF-like domains*” son secuencias proteicas evolutivamente conservadas que están presentes en muchas proteínas de secreción) (*Figura 6*). Las repeticiones R3-R6 contienen la región de unión a los receptores ApoER2 y VLDLR, así como a otras proteínas de transmembrana como el APP (*Jossin y col, 2004*,

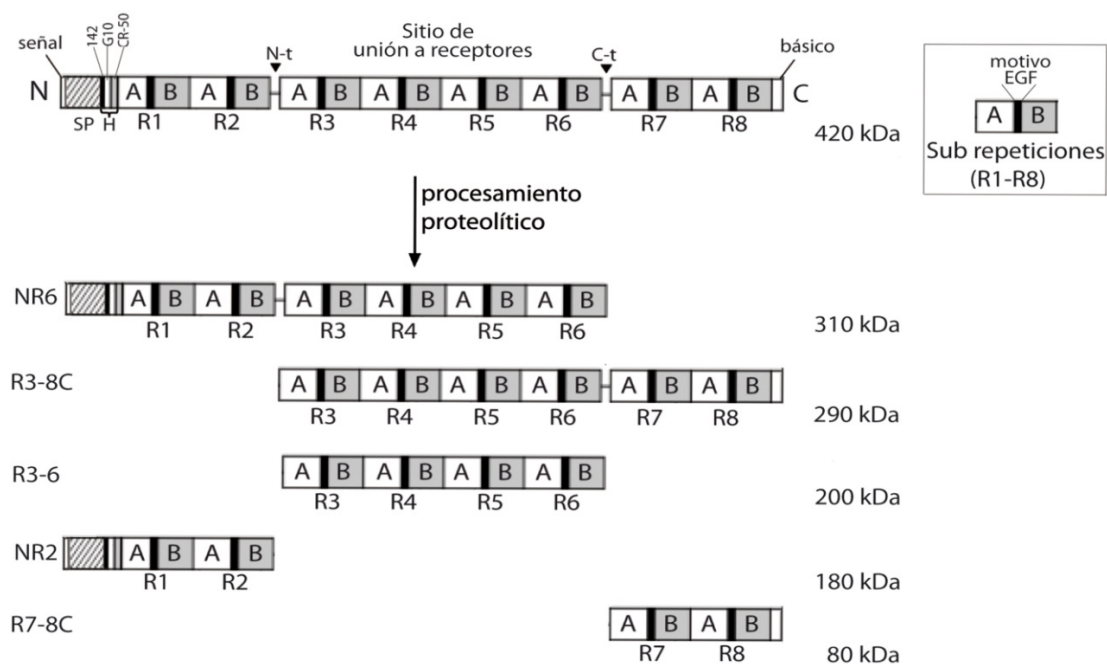


Figura 6: A. Estructura proteica de la reelina. El gen de la reelina codifica una proteína de 3461 aminoácidos. Tras sus modificaciones postraduccionales, resulta una glicoproteína con un peso molecular relativo de 420 kDa. El extremo N terminal contiene un péptido señal y un dominio similar a F espodina (SP), que se continúa con una región única (H), donde se encuentran los epítopos reconocidos por los anticuerpos 142, G10 y CR-50. La región central está formada por 8 repeticiones (R1-R8) separadas por una región similar a EGF (EGF-like domain), estando R8 involucrada en la secreción de la reelina. Finalmente, hay una región altamente básica en el extremo C terminal, que incrementa la eficiencia de la activación de la cascada de señalización. El procesamiento proteolítico de la reelina mediado por metaloproteasas, ocurre en la zona N terminal (N-t), entre las repeticiones R2B-R3A, y en la zona del carboxilo terminal (C-t), entre las repeticiones R6B y R7A. Como resultado de éste procesamiento, se generan cinco fragmentos que se nombran de acuerdo a su composición. A la derecha, se indica el tamaño relativo de cada uno de ellos observados con SDS-PAGE (Figura adaptada de Yasui y col, 2011 y Jossin y col, 2004).

Hoe y col, 2006a; Hoe y col, 2009). Los residuos de cisteínas presentes en estas repeticiones están implicados en la formación de los dímeros covalentes de reelina. En particular, se ha observado que cuando la cisteína ubicada en la repetición R5, altamente conservada en diferentes especies, es sustituida por otros aminoácidos mediante mutagénesis dirigida, la dimerización de la reelina se ve impedida. Además, estos mutantes de reelina son incapaces de activar la cascada de señalización en cultivos neuronales primarios. Esto demuestra que la formación de dímeros estables

son fundamentales para que la reelina ejerza su función biológica (Yasui y col, 2011).

La repetición R8 está involucrada en la secreción celular de la reelina (De Bergeyck y col, 1997). Finalmente, el fragmento C terminal, altamente básico, está involucrado en facilitar la activación de la cascada de señalización a través del adaptador citoplasmático Dab1 (Nakano y col, 2007) (Figura 6).

3.3. El procesamiento proteolítico de reelina

Una vez secretada, la reelina es rápidamente proteolizada en regiones próximas a los extremos N y C terminales. Este procesamiento ocurre *in vivo* y es modulado por diferentes proteasas (Kohno y col, 2009; Lambert de Rouvroit y col, 1999). Hasta ahora, se han identificado metaloproteasas de la familia ADAMT (del inglés, “A Disintegrin and Metalloproteinase with thrombospondin motifs”, una familia de proteasas de la matriz extracelular que se secretan) (ADAMT4 y ADAMT5) y serinoproteasas de la familia tPA que participan en el procesamiento *in vitro* de la reelina (Krstic y col, 2012; Hisanaga y col, 2012). Como producto de este procesamiento se han detectado 5 fragmentos (Figura 6), que presentan una abundancia relativa diferente dependiendo del tejido estudiado (Jossin y col, 2004; Smalheiser y col, 2000). Estos fragmentos se hacen visibles en electroforesis en condiciones desnaturizantes donde se identifican los fragmentos proteicos con diferentes tamaños moleculares (Figura 6).

Aunque todavía no está aclarada cuál es la función fisiológica de estos fragmentos los estudios realizados *in vitro* sugieren que podría existir un vínculo entre el procesamiento de la reelina y su desempeño biológico (Jossin y col, 2004; Nakano y col, 2007; Chameau y col 2009). Al parecer, los productos de procesamiento de la proteína también contribuyen a la formación de estructuras oligoméricas que podrían interferir con los dímeros funcionales (Utsunomiya-Tate y col, 2000; Kubo y col, 2002). Existen estudios que demuestran que los niveles proteicos de reelina, sus

modificaciones postraduccionales y el procesamiento proteolítico se encuentran alterados en varios desordenes cerebrales incluyendo la EA (Fatemi y col, 2001; 2005; Botella-López y col, 2006; 2010; Herring y col, 2012).



CAPÍTULO 4: La reelina y su cascada de señalización

4.1. Los receptores de la reelina

Si bien los dos receptores de reelina ApoER2 y VLDLR pueden desempeñar diferentes funciones, sólo los ratones doble knockout presentan un fenotipo similar a *reeler* (ver *Apéndice*), lo que sugiere que, *in vivo*, la vía principal de acción de la reelina es la que involucra a estos receptores (*Hack y col, 2007*).

ApoER2 y VLDLR son miembros de la familia de receptores de lipoproteínas (LDLR). Junto a sus ligandos, estos receptores tienen una importante función no sólo durante el desarrollo, sino también modulando procesos biológicos en el cerebro adulto, y sus alteraciones se asocian a diversas patologías (*Wilnow y col, 1999; Marzolo y Farfán, 2011*). Esta familia de receptores son glicoproteínas de transmembrana del tipo I y comparten similitudes en su estructura que incluye un gran dominio extracelular, un dominio de transmembrana y una cola citoplasmática relativamente corta (*Figura 7*).

VLDLR tiene un papel importante en el metabolismo de partículas ricas en triglicéridos. Sin embargo, la disrupción homocigota del gen *VLDLR* en ratones no altera el perfil lipoproteico, pero sí ocasiona deficiencias cerebrales que se asocian a la hipoplasia cerebelar. En humanos, la deficiencia de VLDLR es la causa del síndrome del desequilibrio que se caracteriza con un moderado a profundo retraso mental y ataxia (*D'Arcangelo y col, 1999; Hiesberger y col, 1999*). En el cerebro adulto este receptor está involucrado en controlar la función sináptica, lo que resulta relevante a nivel de cognición, aprendizaje, memoria y supervivencia neuronal (*Herz y Chen, 2006*). El gen *VLDLR* está codificado por 19 exones y presenta procesamiento alternativo (o *splicing*) del ARNm. La variante de *splicing* más común expresada en el cerebro es la que carece del exón 16 que codifica para el dominio de O-glicosilación. El receptor VLDLR no está

asociada a dominios lipídicos de raft en la membrana plasmática, lo que influye en el procesamiento y el tráfico del receptor (Martensen y col, 1997; Iijima y col, 1998).

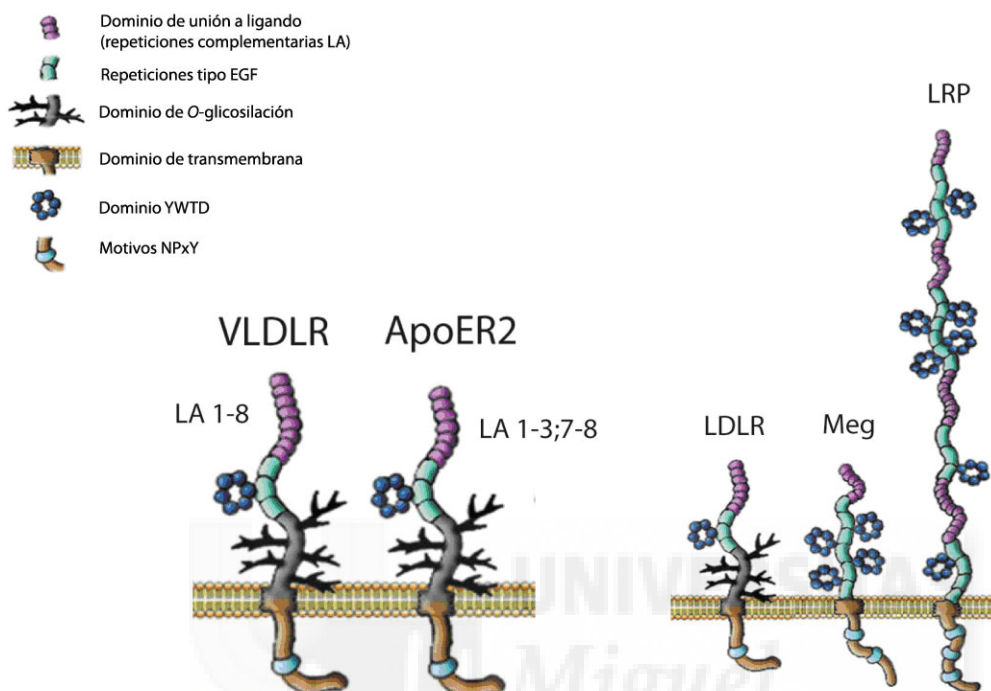


Figura 7: Representación esquemática de la familia de los receptores LDL. Todos ellos comparten estructuras comunes, entre otras el dominio de unión a ligando, compuesto de varias repeticiones complementarias (LA). ApoER2 presenta un *splicing* alternativo en el dominio de unión a ligando, siendo las repeticiones LA1-3,7-8 las fundamentales para su unión con la reelina. VLDLR presenta 8 repeticiones LA para su interacción con la reelina. El dominio de unión a ligando se continúa con un dominio homólogo al EGF (EGF-like domain), que estabiliza la unión del ligando y junto al dominio YWTD modulan el reciclaje de estos receptores. El dominio de O-glicosilación es reconocido por metaloproteasas. La cola citoplasmática contiene al menos un motivo NPXY que interacciona con proteínas adaptadoras intracelulares que contienen dominios de unión a fosfo-tirosinas (PTD). La interacción con las proteínas adaptadoras regula el tráfico y la vía de traducción de señales. (LDLR: receptor de lipoproteína de baja densidad; Meg: Receptor de megalina; LRP: proteína receptora relacionada al receptor de LDL). Figura adaptada de Larios y Marzolo, 2012.

ApoER2 está expresado en neuronas, glía radial, células endoteliales y tejidos epiteliales, así como en los plexos coroideos y epidídimo (Kim y col, 1996; Riddell y col, 1999; Luque y col, 2003; García-Miranda y col, 2010). Inicialmente, se pensaba que ApoER2 participaba únicamente en regular la homeostasis del colesterol en el SNC. Sin embargo, estudios realizados más

tarde, mostraron que la principal función de este receptor en el cerebro embrionario y adulto es iniciar la ruta de señalización de la reelina (*D'Arcangelo y col, 1999*).

Al igual que VLDLR, ApoER2 está sujeto a *splicing*, aunque de una manera mucho más compleja. ApoER2 está codificado por 20 exones. En todas las variantes expresadas en el SNC se da el *splicing* alternativo del exón 5 que codifica las repeticiones LA 4-6 (*Brandes y col, 1997*) y tanto el exón 7 como el 16 también pueden presentar *splicing* alternativo. El exón 7 codifica para la repetición LA-8, con un sitio de reconocimiento a furina, mientras que el exón 16 codifica el dominio de O-glicosilación (*Figura 7*). Por último, el exón 19, ubicado en la región citoplasmática del receptor también puede presentar *splicing* alternativo. Este exón interacciona con proteínas adaptadoras que se asocian al receptor glutamatérgico NMDA (*N-metil-D-Aspartato*) y, al parecer, participaría en la modulación de aprendizaje y memoria inducidos por la reelina, como se discutirá en el *Capítulo 5*.

Una proporción de receptores ApoER2 parece residir en regiones de la membrana plasmática ricos en dominios rafts, lo que influiría en la señalización y el tráfico de éste receptor (*Ridel y col, 2001, Cuitino y col, 2005; Duit y col, 2010*).

4.1.1. Los receptores de la reelina y su procesamiento proteolítico

La actividad biológica de esta familia de receptores está modulada por su procesamiento proteolítico. El procesamiento proteolítico es un evento que parece estar modulado por la unión al ligando extracelular aunque también, en una minoría, podría ocurrir de manera espontánea (*Hoe y Rebeck, 2005*). El estado de glicosilación de los receptores también parece influir en el procesamiento. Ambos receptores presentan variantes de *splicing* en la región de O-glicosilación, y ello los puede hacer más o menos susceptibles al corte proteolítico por secretasas (*May y col, 2003*). La regulación del procesamiento proteolítico de estos receptores puede tener diversos efectos en la función celular.

4.1.1.1. El procesamiento por las metaloproteasas y la generación de fragmentos solubles extracelulares

En el procesamiento de los receptores ApoER2 y VLDLR intervienen las secretasas que también procesan al APP (ver *Capítulo 1*). El dominio extracelular se procesa por metaloproteasas de la familia ADAMs (α -secretasas) y en el caso de algunas variantes de *splicing*, también por furina (una proteasa de la familia “*subtilisin-like proprotein convertase*”). Después de este corte se genera un fragmento soluble extracelular (*Figura 8*) (*Garcia-Touchard y col, 2005*). En cultivo de neuronas corticales de ratón se ha observado que el fragmento soluble del ApoER2, cuando es generado por furina, tiene la capacidad de unirse a la reelina, e interferir así en su unión al receptor de membrana, bloqueando la cascada de señalización (*Koch y col, 2002*). Este procesamiento podría intervenir en la regulación de la señalización de la reelina tanto en cerebro adulto como durante el desarrollo embrionario.

El corte por la α -secretasa deja anclado a la membrana el fragmento carboxilo terminal (CTF), que es posteriormente cortado por la γ -secretasa (*Figura 8*) (*Lui y col, 2009; Willnow, 1999*). El tratamiento con inhibidores de la α -secretasa disminuye no sólo los niveles del ApoER2 soluble extracelular, sino también los fragmentos carboxilo terminal que remanen anclados a la membrana (*Hoe y col, 2007*). Esto confirma que el procesamiento secuencial de los receptores de reelina por las secretasas se inicia por la acción de la α -secretasa

4.1.1.2. La γ -secretasa y la generación del fragmento intracelular

En diversos receptores de la familia LDL, tras el procesamiento por ADAMs, queda un fragmento anclado a la membrana. Este hecho fue puesto de manifiesto por estudios del grupo de Herz (*May y col, 2002*), donde observaron la acumulación de pequeños fragmentos de 25 y 18 kDa del receptor LRP en cultivo primario de neuronas de rata, tratado con inhibidores de la γ -secretasa. La acumulación de estos dos fragmentos correspondió a

dos variantes de *splicing* del receptor. Este procesamiento también fue observado para el ApoER2, en donde se observó una mayor acumulación del fragmento CTF cuando los modelos celulares eran inducidos con ligandos del receptor como la propia reelina, $\alpha 2$ -macroglobulina o ApoE (Hoe y Rebeck, 2005; Hoe y col, 2006a).

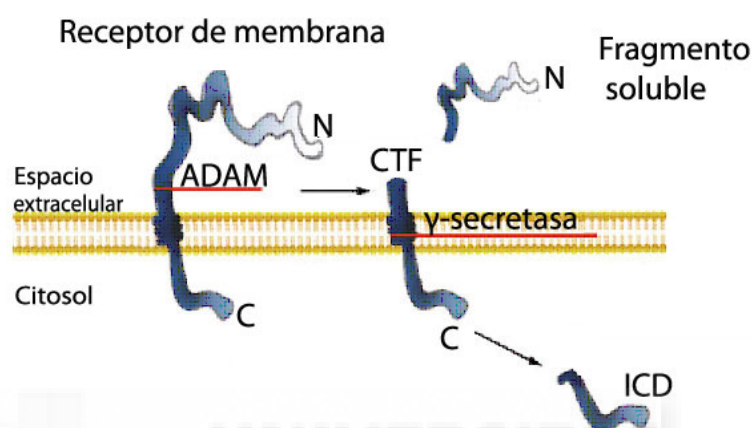


Figura 8: Descripción general del procesamiento proteolítico de receptores de reelina. Inicialmente, el receptor es procesado por metaloproteasas de la matriz extracelular; generando un fragmento extracelular soluble. Luego, el fragmento del receptor que permanece asociado a la membrana (CTF) es procesado por el complejo γ -secretasa generándose un fragmento intracelular soluble (ICD). El procesamiento proteolítico de estos receptores ocurre después de la unión a la reelina, aunque también, en un pequeño porcentaje es procesado constitutivamente. Los fragmentos CTF e ICD pueden interactuar con adaptadores u otras proteínas celulares regulando diversas rutas de señalización. Figura adaptada de Larios y Marzolo, 2012.

El corte del CTF por la γ -secretasa libera un fragmento soluble intracitoplasmático (ICD; del inglés *intracellular cytoplasmic domain*) (Figura 8). Este fragmento ICD podría modular varias funciones intracelulares mediante la interacción con diferentes proteínas citoplasmáticas (Hoe y col, 2006 a-c; May y col, 2003). Incluso puede migrar a la región nuclear donde actúa modulando la expresión de genes (May y col, 2002; Balmaceda y col, 2013), de manera similar a lo que ocurre con otros sustratos de la γ -secretasa, como la proteína APP o Notch.

Como se ha comentado, el procesamiento por la acción de γ -secretasa genera fragmentos intracelulares de sus sustratos que participan en varias

respuestas celulares. En el cerebro, el corte por la γ -secretasa de N-cadherinas, Notch e incluso APP, participa en procesos neuronales tales como la sinaptogénesis, la transmisión sináptica y el crecimiento de neuritas. Además, como vimos en el *Capítulo 2*, la actividad de la γ -secretasa se encuentra alterada en algunas formas de Alzheimer familiar, con mutaciones sobre las presenilinas. En la EA esporádica también se presume una alteración en la actividad γ -secretasa, que generaría más procesamiento amiloidogénico del APP. Por lo que sería interesante analizar de qué manera la actividad de la γ -secretasa puede intervenir en el procesamiento de los receptores de la reelina y, en consecuencia regular su ruta de señalización, procesos que podrían estar alterados en la patología de la EA.

4.2. *Reelina y su señalización celular*

Los estudios bioquímicos y genéticos realizados en ratones *reeler* o tipo *reeler* han permitido dilucidar la vía de señalización celular de la reelina. Una importante conclusión es que en ratones que presentan la cascada de señalización de reelina alterada, la proteína tau se encuentra en un estado hiperfosforilado (*Hiesberger y col, 1999*). Esto condujo a la identificación de una vía dependiente de la reelina capaz de modular la activación de proteínas del citoesqueleto, como tau.

La traducción de la señal mediada por la reelina no requiere la presencia de co-receptores adicionales (*Jossin y col, 2003*). En cultivos celulares, es suficiente la expresión de la reelina, sus receptores ApoER2/VLDLR y la proteína adaptadora Dab1 para reconstruir la vía de señalización de la reelina (*Mayer y col, 2006*), indicando que estos son los componentes claves que traducen su señal intracelular.

La interacción de reelina con sus receptores promueve el reclutamiento de Dab1 (*Figura 9*) (*Howell y col, 1999; 2000; D'Arcangelo y col, 1995*). Dab1 es una molécula adaptadora intracelular que se expresa en neuronas que responden a la reelina. Su función como molécula adaptadora consiste en formar complejos de señalización mediante interacciones proteína-proteína

(Howell y col, 1997b). A través de su dominio PTB (*dominio de unión de fosfotirosinas N terminal*) Dab1 interactúa con fosfolípidos de la membrana plasmática ricos en fosfoinositoles y con proteínas de transmembrana que contengan los motivos NPXY, como ApoER2 y VDLR (*Figura 9*). La interacción entre los dominios PTB-NPXY resulta fundamental para desencadenar una señal intracelular (*Figura 9.a*) (Stolt y Bock, 2006; Trommsdorff y col, 1998). De este modo, la interacción entre Dab1 y ApoER2/VLDLR, facilita que Dab1 se aproxime a las regiones de membranas enriquecidas en quinasas de la familia tirosina quinasas src (SFK) y resulta fosforilado (*Figura 9.b*) (Jossin y col, 2003; Howell y col, 1997b). Dab1 contiene una región con 5 residuos de tirosinas, de las cuales dos (Y198 y Y220) son fosforiladas en respuesta a la reelina (Tissir y Goffinet, 2003).

Dab1 fosforilado será capaz de modular la activación de diferentes rutas de señalización (*Figura 9*). Una de estas rutas se inicia con la activación de la quinasa citosólica fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), (un regulador central de varias funciones celulares) e induce la activación de la vía Akt/PKB (*proteína quinasa B*) (*Figura 9 c*). Esta ruta culmina con la fosforilación y consecuente inactivación, de la quinasa GSK-3 β , una de las principales quinasas que fosforila a la proteína tau, como se comentó en el *Capítulo 1* (Beffert y col, 2002, Ballif y col 2003, Bock y col, 2004).

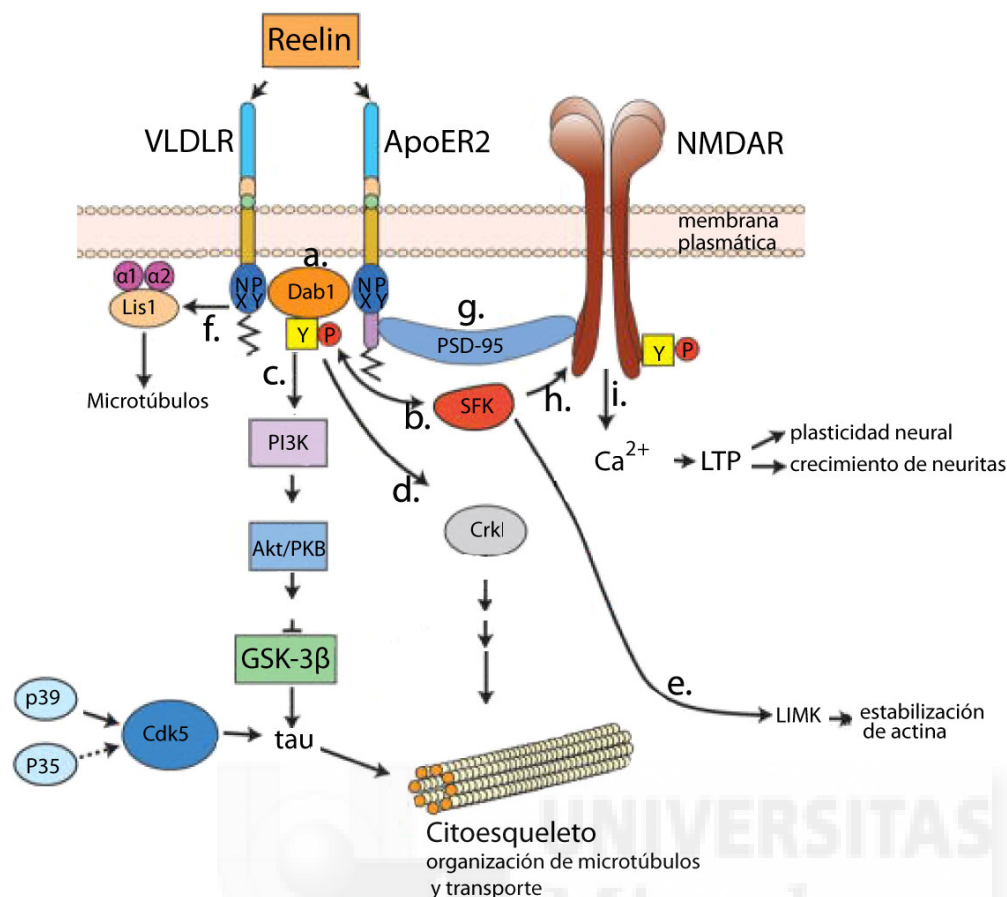


Figura 9. Ruta de señalización de la reelin. La unión de dímeros de reelin a sus receptores recluta a la molécula adaptadora Dab1 (a.) e induce su fosforilación mediante la familia tirosin-quinasa SFK (b.) activando vías de señalización alternativas. La vía PI3K, Akt/PKB (c.) finaliza con la inhibición de la quinasa GSK-3β, una de las principales quinasas que fosforilan a la proteína estabilizadora de microtúbulos tau. Otras rutas alternativas activadas por Dab1, son las de las quinasas Crk (d.), LIM1 (e.) y Lis1 (f.). Todas estas vías están implicadas en la dinámica de microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. Además, la unión reelin-ApoER2 también puede regular la activación de los receptores NMDA. El dominio citoplasmático de ApoER2 interactúa con el receptor NMDA a través de la proteína post-sináptica PSD-95 (g.). Esta interacción favorece la fosforilación del receptor glutamatérgico (h.). La activación de receptores NMDA (NMDAR) regula los procesos neuronales involucrados en aprendizaje y memoria (i.). Figura adaptada de *Herz y Chen, 2006*.

Otra de las rutas de señalización moduladas por Dab1 fosforilado involucra el reclutamiento de la familia de quinasas Crk y de la quinasa LIM (Figura 9. d-e). Ambas vías están involucradas en modular la dinámica del citoesqueleto mediante la redistribución de la actina (Bior y Ballif, 2013). A través del receptor VLDLR, la fosforilación de Dab1 también puede reclutar a proteínas involucradas en regular la dinámica de microtúbulos, como el complejo de lisencefalina 1 (LIS1) (Figura 9.f). Esta ruta activada por la

reelina participa en la regulación de la migración neuronal y en la laminación cortical (*Assadi y col, 2003*).

Después de la unión a la reelina y de la fosforilación de Dab1, los receptores de la reelina son internalizados mediante vesículas recubiertas de clatrina, comenzando su vía de degradación (*Riddell y col, 2001; Cuitino y col, 2005*); aunque estos aspectos están en discusión (*Sun y Soutar, 2003*).

Como se menciona en la sección 4.2 de este capítulo, estos receptores presentan una distribución diferente en la membrana plasmática. En el cerebro, parece ser que ApoER2 está mayoritariamente anclado a los dominios raft de la membrana (*Riddell y col, 2001*), mientras que VLDLR no se encuentra asociado a estas regiones (*Duit y col, 2010*). La distribución de los receptores en la membrana plasmática podría influir sobre la regulación de la señalización de la reelina en el cerebro.

Finalmente, Dab1 fosforilado recluta a ligasas de ubiquitina e induce su poliubiquitinación, degradándose mediante la vía del proteosoma (*Arnaud y col, 2003; Bock y col, 2004*). La degradación de Dab1 puede ser también un factor importante en la regulación de la señalización de la reelina.

En resumen, la cascada de señalización activada por la reelina mediante sus receptores ocurre mediante el reclutamiento y la fosforilación de Dab1. De este modo, se activan diversas rutas de señalización que modulan la dinámica de microtúbulos y la función neuronal.

CAPÍTULO 5: La reelina y la enfermedad de Alzheimer

5.1. Función de la reelina en la plasticidad sináptica en adultos

El neurotransmisor glutamato y su receptor NMDA están involucrados en numerosas funciones dentro del sistema nervioso, teniendo un papel clave en la plasticidad sináptica. Estos receptores activan y consolidan la sinapsis, mediante mecanismos de plasticidad. La potenciación a largo plazo (LTP), una forma de plasticidad sináptica que está en la base de los procesos de aprendizaje y memoria en el cerebro adulto, también implica la activación de los receptores NMDA en el hipocampo.

La reelina modula la función de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA a través de la interacción con su receptor ApoER2 (*Chen y col, 2005*). Esto es posible porque existe una asociación física entre el ApoER2 y el receptor NMDA. Ambos receptores co-inmunoprecipitan en modelos celulares, y colocalizan en las densidades post-sinápticas de regiones CA1 de hipocampo (*Hoe y col, 2006 b; Beffert y col, 2005*). Esta interacción entre el receptor de NMDA y el ApoER2 se produce a través de la proteína post-sináptica PSD-95 (*Figura 9.g*), que permite el reclutamiento de proteínas, entre ellas, quinasas de la familia SFK (*Figura 9.h*) (*Hoe y col, 2006 b*). Estas quinasas activarían al receptor NMDA por fosforilación en sus subunidades NR2A y NR2B (*Hoe y col, 2006 b*). La activación de los receptores NMDA regula además del flujo de iones K^+ y Na^+ , el flujo de Ca^{2+} intracelular (*Figura 9.i*), lo cual dispara una cascada de sistemas de segundos mensajeros que inducen acciones muy diversas, tales como la regulación de la expresión de genes involucrados en procesos sinápticos (*Chen y col, 2005; Beffert y col, 2006*).

La capacidad que tiene la reelina de modular la función sináptica y la plasticidad refuerza aún más la hipótesis de que una alteración en su ruta de señalización podría formar parte de los mecanismos alterados en desordenes neurológicos y neuropsiquiátricos. Se ha observado que el tratamiento de regiones de hipocampo con $A\beta$ altera la sinapsis, afectando la

activación de los receptores NMDA. Sin embargo, este efecto se revierte cuando las neuronas son incubadas posteriormente con la reelina (*Durakogligil y col, 2009*). Al parecer, la reelina antagoniza el efecto que tiene el A β sobre la sinapsis. De este modo, tanto un incremento de A β , como sucede en la EA, o una alteración en la señalización de la reelina, o ambos efectos juntos, podrían alterar la plasticidad sináptica, llevando a una disfunción neuronal.

5.2. La reelina y su vínculo con la enfermedad de Alzheimer

La primera asociación entre la reelina y la EA se manifestó por la observación de una hiperfosforilación en la proteína tau tanto en los ratones *reeler* como en el doble *knock-out* para los receptores ApoER2/VLDLR (*Hiesberger y col, 1999*). Diversos autores recogen en sus publicaciones evidencias que muestran el vínculo existente entre la reelina y la EA (*Botella-López y Sáez-Valero, 2008; Knuesel, 2010; Folson y Fatemi, 2013*). Apoyando estos resultados, se ha observado que tanto la proteína reelina como su transcrito están aumentados en la corteza frontal de pacientes con EA (*Sáez-Valero y col, 2003; Botella-López y col, 2006; 2010*).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la reelina presente en LCR está incrementada en pacientes con un diagnóstico clínico temprano de Alzheimer, respecto a los casos controles de edad semejante (*Sáez-Valero y col, 2003; Botella-López y col, 2006*). Este aumento en los niveles de la reelina en el LCR de pacientes con la EA se correlaciona positivamente con el incremento de la proteína tau, un marcador clásico de la patología (*Botella-López y col, 2006*).

La primera evidencia que demostró la relación entre la reelina y el A β , se manifestó en un modelo de ratón doble transgénico APP/PS1 que además de sobre-expresar el péptido A β , genera placas amiloide. En dicho modelo de ratón se ha demostrado la presencia de la reelina en las placas amiloides del hipocampo (*Wirhys y col, 2001*). Aun más, nuestro grupo demostró que la corteza cerebral de modelos de ratones Tg2576 (un modelo que

sobreexpresa APP conteniendo una mutación caracterizada como “*Swedish mutation*”) presenta niveles elevados de la proteína reelina (*Botella-López y col, 2010*). Todas estas evidencias sugieren que es posible que la alteración en el metabolismo del APP promueva a su vez una expresión alterada de la reelina en el cerebro de personas con Alzheimer.

En paralelo, se ha observado que durante un envejecimiento no patológico, los agregados proteicos presentes en regiones corticales de roedores y primates están enriquecidos de agregados de reelina (*Knuesel y col, 2009; Madhusudan y col, 2009; Doehner y col 2010*). Asociado al envejecimiento no patológico estos agregados colocalizan con placas amiloides no fibrilares.

Para poder responder si el metabolismo amiloide anormal es el responsable de las alteraciones en la expresión de la reelina asociadas a la EA, nuestro grupo analizó los niveles de la proteína en corteza de personas con el síndrome de Down (*Botella López y col, 2010*). En *Capítulo 2* se ha discutido que la mutación que provoca el síndrome de Down causa una sobreexpresión de APP y en consecuencia, se ven incrementados sus fragmentos proteolíticos incluyendo el A β . De hecho, una gran parte de las personas con síndrome de Down presentan depósitos de placas neuríticas al alcanzar la cuarta-quinta década de vida (*Mann, 1988*). Nuestro grupo confirmó que en las regiones corticales de personas con el síndrome de Down la reelina muestra un incremento en sus niveles proteicos y transcripcionales (*Botella- López y col, 2010*).

Pero, ¿de qué modo podría afectar la acumulación de péptidos A β la expresión de la reelina? Nuestro grupo observó que el tratamiento de cultivos celulares con A β exógeno determina un aumento en los niveles de reelina, pero también influye en su glicosilación (*Botella López y col, 2010*). Este efecto inducido por A β *in vitro*, se correlaciona con las alteraciones en el patrón de glicosilación de reelina observadas en muestras humanas de EA, tanto a nivel cerebral como en el LCR (*Botella López y col, 2006; 2010*). Estos estudios manifiestan que la presencia de A β podría influir sobre la expresión y la glicosilación de la reelina en personas con Alzheimer.

Primero, respecto a los niveles aumentados de reelina en el cerebro de sujetos con EA, es importante señalar que aunque los datos obtenidos por algunos grupos de investigación apoyan nuestras observaciones (*Kramer y col, 2010; Santa-María y col, 2010*), existen trabajos que reportan resultados contrapuestos, al no encontrar aumentos de reelina en el LCR de personas con la EA (*Ignatova y col, 2004*) e incluso detectan valores disminuidos en regiones cerebrales de la corteza entorrinal e hipocampo de individuos con la EA, o bien en el cerebro de animales transgénicos (*Chin y col, 2007; Hoe y col, 2009; Herring y col, 2012*).

Dada la correlación existente entre la falta de reelina y la hiperfosforilación de tau, si la situación en el cerebro de sujetos de EA fuera de niveles disminuidos de la reelina, ésta condición se asociaría con el progreso de la enfermedad; mientras que los niveles aumentados de reelina, podrían asociarse a una condición ventajosa, tratándose quizás de un mecanismo de defensa del cerebro. No obstante, los niveles aumentados de la reelina en cerebros de pacientes con la EA se analizan al término de la patología, tras años de padecer la misma y es poco probable que en ese estado se mantuviera una alta expresión de reelina como parte de un mecanismo compensatorio/defensa. En este sentido, el hecho de que la reelina aumentada en el cerebro de sujetos con EA presenta glicosilación alterada puede ser de máxima relevancia.

Está ampliamente estudiado que los procesos de glicosilación intervienen no sólo en la síntesis y el ensamblaje proteico, sino también en la localización subcelular, en la interacción con otras proteínas, en la actividad biológica y en la vida media de las glicoproteínas. En este sentido se han descrito alteraciones en la glicosilación de diversos tipos de glicoproteínas en muestras de personas con la EA (*Guevara y col, 1998; Fodero y col, 2001, Kanninen y col, 2004, Silveyra y col, 2006*). Por lo que podríamos suponer que la reelina anormalmente glicosilada presente en el cerebro humano con Alzheimer puede presentar una función biológica alterada. Si esto fuera así, se establecería una condición desfavorable para la actividad sináptica llevando a una disfunción neuronal, y aunque sus niveles estuvieran

aumentados en sujetos con EA reflejarían una condición desfavorable que podría contribuir al progreso de la enfermedad.



4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el cerebro adulto la reelina regula, tras unirse a sus receptores ApoER2 y VLDLR, procesos involucrados con la formación de la memoria LTP y plasticidad sináptica (*Chen y col, 2005; Beffert y col, 2005*). También se ha determinado que cambios en la regulación génica y la expresión de la reelina causan déficit cognitivos presentes en varios desordenes neuropsiquiátricos (ver revisión de *Folson y Fatemi, 2013*). Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio observaron que en muestras de LCR y cerebros humanos con Alzheimer la expresión de reelina está aumentada y además existen alteraciones en su patrón de glicosilación (*Sáez-Valero y col, 2003; Botella-López y col, 2006; 2010*). También observaron que el tratamiento de células en cultivo con el péptido A β producía una alteración en la expresión y glicosilación similares a la encontrada en corteza de EA.

Queda por determinar que significado y consecuencias puedan tener estos niveles aumentados de reelina en el cerebro de enfermos de Alzheimer. Una mejor comprensión de los mecanismos de regulación y la interacción con su receptor ApoER2 también son claves para la adecuada comprensión del papel de reelina en la patología. La reelina se muestra como una proteína de alto interés en la EA dado que aparece afectada por el péptido A β y su vía de señalización, además de regular procesos relacionados con memoria y aprendizaje, modula el grado de fosforilación de tau; por lo que reelina aparece como una molécula puente entre el péptido A β y la proteína tau.

Nuestras hipótesis de trabajo se centran en que las modificaciones presentes en la reelina, bien de corteza humana EA, bien inducibles *in vitro* en células tratada con A β , pueden comprometer su funcionalidad y por tanto la actividad biológica derivada de su vía de señalización. Igualmente, el procesamiento del receptor ApoER2 de reelina, podría tener un papel fundamental en el control de su vía de señalización, pero también directamente en la expresión de la propia reelina.

De este modo, nos propusimos investigar los siguientes objetivos:

1. *Evaluar si la reelina anormalmente glicosilada encontrada en cerebros con Alzheimer e inducible por el péptido A β presenta alteraciones en su funcionalidad biológica*

Para ello, propusimos analizar los siguientes parámetros:

- i. Analizar los efectos de la glicosilación alterada de la reelina, inducida por A β , respecto a su dimerización.
 - II. Analizar como afectan las alteraciones en la glicosilación de reelina en la interacción con su receptor, mediante ensayos de afinidad *in vitro*.
 - III. Evaluar la capacidad que tiene la reelina anómala en modular su cascada de señalización celular, analizando el estado de fosforilación de diferentes componentes de la vía.
2. *Analizar el efecto regulador que ejerce el procesamiento del receptor ApoER2 sobre la propia expresión de la reelina.*

Para lo cual, hemos propuesto:

- IV. Estudiar el procesamiento del receptor ApoER2 por la γ -secretasa, modulando farmacológicamente la actividad del complejo proteolítico mediante inhibidores de su subunidad catalítica, PS1, e investigar si este procesamiento presenta efectos sobre la reelina en modelos *in vitro*.
- V. Estudiar el procesamiento del receptor ApoER2 y su efecto sobre la expresión proteica y transcripcional de la reelina empleando un modelo de raton *knock-out* de PS1.
- VI. Analizar la traslocación al núcleo del fragmento intracelular del ApoER2, generado por el procesamiento por γ -secretasa, y estudiar su efecto sobre la expresión génica de la reelina empleando modelos *in vitro*.

5. RESULTADOS

OBJETIVO 1. *“La reelina anormalmente glicosilada presenta alteraciones en su función biológica”*

Cuchillo-Ibáñez I, Balmaceda V, Botella-López A, Rabano A, Ávila J, Sáez-Valero J. Beta amyloid impairs reelin signaling. PlosOne, 2013; 8 (8): e72297.

Sinopsis:

La reelina es una glicoproteína cuya expresión en cerebro está vinculada con la modulación de los procesos de aprendizaje y memoria a través de su cascada de señalización. Concretamente, la vía de señalización de la reelina modula los estados de fosforilación de la proteína tau, la principal proteína que genera los ovillos neurofibrilares, las lesiones intracelulares típicas de la EA; así como la actividad de receptores ligados a memoria y aprendizaje como los de NMDA. Previamente, nuestro grupo reportó niveles elevados de reelina tanto en cerebros como en LCR de sujetos con la EA, en comparación con los de individuos sin demencia. También se comprobó que el tratamiento con el péptido A β modifica la glicosilación de la reelina obtenida en cultivos celulares. En este estudio, hemos demostrado que las glicoformas de la reelina obtenidas en presencia de A β tiene una menor capacidad de modular su cascada de señalización, fallando en fosforilar a la proteína adaptadora Dab1, que a su vez deja de modular la fosforilación de la quinasa GSK-3 β y en consecuencia se mantiene activa, lo que promueve una mayor fosforilación de la proteína tau. Por otra parte, el tratamiento de cultivos primarios de corteza de ratón con glicoformas anormales de la reelina también incrementa los niveles de la proteína 14-3-3, una proteína que interviene en la modulación por fosforilación de diversas proteínas y que, en particular, mantiene activa a la quinasa GSK-3 β fosforilada. De este modo, determinamos que la presencia de una reelina anormalmente glicosilada genera niveles elevados de la proteína tau altamente fosforilada.

Para descartar que los efectos observados se debieran a la propia presencia del péptido A β , siempre se procedió a eliminar en lo posible el péptido de nuestras preparaciones, aunque nunca podemos estar seguros de que mínimas trazas contribuyan de algún modo a alterar la vía de la reelina. De cualquier modo también producimos glicoformas de reelina alteradas por un método alternativo, independiente de A β , un inhibidor de enzimas manosidasas. El uso de un inhibidor de manosidas nos permitió contar con preparaciones de reelina de glicosilación alterada que también fallaron en modular los niveles de fosforilación de tau, lo que apoya que la glicosilación anómala de la reelina puede provocar la pérdida de su función.

La ineficiencia que muestran las glicoformas de reelina alterada para activar su vía de señalización, probablemente se deba a una afinidad disminuida a ApoER2, el principal receptor de reelina en el cerebro adulto. La reelina interacciona con sus receptores bajo su forma dimérica, y hemos comprobado que la reelina expresada en presencia del péptido A β resultó ser menos eficiente en formar dímeros covalentes estables, viéndose favorecida la aparición de oligómeros de gran tamaño, lo que probablemente determina un impedimento en la interacción con su receptor. De igual modo, la reelina presente en la corteza de personas con Alzheimer muestra la misma tendencia de formar complejos oligoméricos distintos de los dímeros funcionales. En resumen, los resultados que hemos obtenido en este trabajo sugieren que en el cerebro de sujetos con Alzheimer, a pesar de contar con niveles elevados de la reelina, ésta no resultaría funcional, viéndose comprometida su ruta de señalización. Esta alteración podría contribuir al progreso de la enfermedad, y demuestra la influencia nociva que tiene el péptido A β sobre la glicosilación y la funcionalidad de la reelina.

Beta-Amyloid Impairs Reelin Signaling

Inmaculada Cuchillo-Ibáñez^{1,2}, Valeria Balmaceda^{1,2}, Arancha Botella-López^{1,2}, Alberto Rabano^{2,3}, Jesus Avila^{2,4}, Javier Sáez-Valero^{1,2*}

1 Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain, **3** Banco de Tejidos de la Fundación CIEN, CIEN Foundation, Carlos III Institute of Health, Alzheimer Center Reina Sofia Foundation, Madrid, Spain, **4** Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cantoblanco, Madrid, Spain

Abstract

Reelin is a signaling protein increasingly associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease that relevantly modulates tau phosphorylation. We have previously demonstrated that β -amyloid peptide ($A\beta$) alters reelin expression. We have now attempted to determine whether abnormal reelin triggered by $A\beta$ will result in signaling malfunction, contributing to the pathogenic process. Here, we show that reelin forms induced by β -amyloid are less capable of down-regulating tau phosphorylation via disabled-1 and GSK3 β kinase. We also demonstrate that the scaffold protein 14-3-3 that increases tau phosphorylation by modulating GSK3 β activity, is up-regulated during defective reelin signaling. Binding of reelin to its receptor, mainly ApoER2 in the brain, relays the signal into the cell. We associate the impaired reelin signaling with inefficiency of reelin in forming active homodimers and decreased ability to bind efficiently to its receptor, ApoER2. More remarkably, reelin from Alzheimer cortex shows a tendency to form large complexes instead of homodimers, the active form for signaling. Our results suggest that reelin expression is altered by $A\beta$ leading to impaired reelin signaling.

Citation: Cuchillo-Ibáñez I, Balmaceda V, Botella-López A, Rabano A, Avila J, et al. (2013) Beta-Amyloid Impairs Reelin Signaling. PLoS ONE 8(8): e72297. doi:10.1371/journal.pone.0072297

Editor: Javier Vitorica, Universidad de Sevilla, Spain

Received: April 15, 2013; **Accepted:** July 15, 2013; **Published:** August 12, 2013

Copyright: © 2013 Cuchillo-Ibáñez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (PS09/00684; PI12/00593), Fundación Ramón Areces, and CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III from Spain. VB is supported by a JAE-Predoc fellowship from the CSIC, Spain, co-financed by the Fondo Social Europeo (FSE), E.C. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: j.saez@umh.es

Introduction

Increasing evidence suggests that Reelin expression is altered in the Alzheimer's disease (AD) brain. Reelin is a signaling protein which modulates synaptic function and plasticity in the mature brain, and its signaling cascade can control tau phosphorylation [1,2]. The binding of Reelin to the transmembrane liporeceptors, apolipoprotein receptor 2 (ApoER2) or the very-low-density liporeceptor (VLDLR), relays the signal into the cell via the adapter Dab1 (disabled-1), initiating a cascade of intracytoplasmic events that ends with limited phosphorylation of the microtubule-associated tau protein, via inhibition of Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) activity; for a review, see [3].

Pathological hyperphosphorylation and aggregation of tau, concurrent with extracellular deposits of the β -amyloid protein ($A\beta$), are features of AD. Lack of Reelin is associated with increased tau phosphorylation [4], and mutations that prevent the Reelin-dependent induction of Dab1 tyrosine phosphorylation also cause tau hyperphosphorylation [5]. Reduced Reelin expression has been shown to accelerate tau

pathology in transgenic AD mice [6]. Accordingly, Reelin depletion has been reported in affected brain areas of AD subjects and β -amyloid transgenic mouse models [7,8]. However, ours and other studies have demonstrated an increase in Reelin levels in the AD brain and in mice over-expressing $A\beta$ [9–12]. This could be induced by β -amyloid as $A\beta$ treatment elevates Reelin levels [11]. Increase in expression of the Reelin gene has been confirmed in two different AD cohorts [10,11], and has been associated with the specific vulnerability of neurons to AD [13]. We also have previously demonstrated that $A\beta$ alters Reelin glycosylation, resulting in a glycosylation pattern similar to that of Reelin from cortex and cerebrospinal fluid (CSF) of AD patients [10,11]. The physiological consequences of alterations in Reelin expression are still unclear.

We have now attempted to determine whether abnormal Reelin triggered by $A\beta$ treatment will result in signaling malfunction. In a cellular system, we study if an altered form of Reelin affects the Reelin signaling pathway, including Dab1, GSK3 β and ultimately tau phosphorylation. We also illustrate that $A\beta$ -altered Reelin glycoforms alters intracellular levels of

the scaffold protein 14-3-3, a protein which promotes phosphorylated GSK3 β to remain active, suggesting that this mechanism is also affected by impaired Reelin signaling. Finally, we investigated whether abnormal Reelin fails to bind ApoER2, the main brain receptor, and to form efficient signaling homodimers. We further examined the ability of Reelin species present in the AD brain to form homodimers.

Material and Methods

Collection of human brain samples

This study was approved by the ethics committee of the Miguel Hernandez University and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. Brain samples were obtained from the UIPA neurological tissue bank (Unidad de Investigación Proyecto Alzheimer, Madrid, Spain). After neuropathological examination, sporadic AD cases were categorized as stages V-VI of Braak and Braak (five cases; 66 \pm 7 years). Samples from ND individuals (non-demented control subjects; five cases; 73 \pm 2 years) corresponded to cases with no clinical dementia and no evidence of brain pathology. The mean postmortem interval of the tissue was 6 h, with no significant difference between each group of samples.

Preparation of human brain samples

Samples (0.2 g) of human frontal cortex were homogenized (10% w/v) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 / 150 mM NaCl/0.5% Triton X-100/0.5% Nonidet P-40 containing a cocktail of proteinase inhibitors (10,11). The homogenates were sonicated and centrifuged at 20,000 \times g at 4 $^{\circ}$ C for 20 min; the supernatant was collected and frozen at -80 $^{\circ}$ C. When samples were prepared for native-blue electrophoresis, the solubilization buffer contained 25 mM Bis-Tris pH 7.0, 0.5% n-dodecyl-beta D-maltoside (DDM), 20% glycerol.

Cell cultures

SH-SY5Y cells were seeded in 75cm 2 flasks at a density of 7 \times 10 5 cells/flask and cultured in DMEM supplemented with Glutamax (Invitrogen), 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. To differentiate the cells, serum was reduced to 3% and 10 μ M all-trans-retinoic acid (Sigma) was added for 5 consecutive days. Following this, serum was further reduced to 0.5% and 50 ng/mL of brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Sigma) was added for the remaining culture period. Suspensions of β -amyloid 1-42 (A β 42) or scrambled control peptide (A β sc; AIAEGDShVLKEGAYMEIFDVQGHVFGGKIFRVVDLGSNVA) (both from American Peptide Company Inc.) dissolved in sterilized distilled water at a concentration of 1 mg/mL, were added one day after BDNF incubation at a final concentration of 10 μ M, and this treatment was repeated 2 days later. The cell medium was no longer changed. Cells were cultured in presence of A β 42 or A β sc for 4 consecutive days. In some experiments, cells were treated with a lower dose of 1 μ M A β 42. Alternatively, cells were also treated for 24 h with 100 μ M of deoxymannojirimycin (DMJ, Tocris) instead of A β .

SH-SY5Y cells cultured in 96-well plates and treated as previously described, were assessed for cell viability using the tetrazolium assay (MTS; CellTiter 96 \oplus Aqueous Assay, Promega) according to the manufacturer's instructions.

For primary cortical neuron cultures, cortical lobes from E16.5 mice embryos were trypsinized and dissociated in Hanks' balanced salt solution (Life Technologies). Neurons were plated onto 35-mm dishes (1.3 \times 10 6 cells/dish) and maintained in Neurobasal medium (Invitrogen) containing B27 supplements (GIBCO BRL), 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM glutamine. After 7 days, cortical neurons were treated with Reelin for 1 h. Cells were washed with Hank's balanced salt solution (HBSS, Life Technologies) and scraped into 6 \times SDS-PAGE sample buffer, heated at 100 $^{\circ}$ C for 5 min and cell lysates stored at -80 $^{\circ}$ C.

Reelin preparation

Medium from untransfected SH-SY5Y cells treated with (or without) A β was collected and centrifuged at 1,500 \times g for 5 min (this pellet was reserved for Western blotting analysis). The supernatant was filtered and concentrated using a Microcon filter with a 100 kDa cutoff (Millipore) to obtain enriched Reelin supernatants. Alternatively, in some cell media A β was removed by immunoprecipitation with the anti-A β polyclonal antibody 6E10 (Covance). Magnetic beads (PureProteome, Millipore) were coupled to 6E10 following manufacturer's instructions. The 6E10-beads were incubated with medium from SH-SY5Y cells treated with (or without) A β for 4 h at 4 $^{\circ}$ C, then centrifuged at 500 \times g and the supernatant fraction re-incubated with fresh magnetic 6E10-beads at the same conditions. Immunocomplexes were separated by centrifugation and A β content was determined in the unbound fraction. These two successive incubations with the anti-A β beads ensured that most of the peptide in the samples was removed.

Cell adhesion assay

Six-well plates were treated with nitrocellulose dissolved in methanol and left to dry. Then, wells were coated with equal amounts of Cont-Reelin or A β -Reelin, and left overnight at 37 $^{\circ}$ C. SH-SY5Y cells were plated and, after 2 h incubation, cells were washed extensively with Phosphate buffered saline. The remaining cells were counted. In some experiments Cont-Reelin was pre-incubated with the CR50 antibodies (20 μ g/mL) for 1 h before coating.

Western Blotting and antibodies

For Reelin detection brain extracts (30 μ g) or SH-SY5Y supernatant samples (30 μ l) were boiled for 3 min, and then resolved on 6% SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE). Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes and incubated with the anti-Reelin 142 antibody (1:500 dilution, Merck Millipore). Electrophoresis was allowed to proceed at a voltage that prevented excessive heat generation that affects Reelin detection [10,14]. As Reelin content varied broadly between different brain extracts, preliminary analysis was performed to ensure that the immunodetection signals lie within a linear range. For detection of other proteins, extracts from

cultured neurons (15–25 μ l) were boiled for 5 min in SDS-PAGE sample buffer. Levels of total tau (1:10000 dilution; DakoCytomation) and phospho-tau (AT8, Ser²⁰², Innogenetics, at 1:2000 dilution; PHF13, Ser³⁹⁶, Abcam, at 1:2000 dilution) were detected by Western blot following resolution on 10% SDS-PAGE. Total GSK-3 (1:2000 dilution; Abcam), GSK3ser9 (1:2000 dilution; Abcam) and Dab1 (1:2000 dilution; Exalpha Biologicals, Inc) were resolved on 7.5% SDS-PAGE. PhosphoBlocker (5% from Cell Biolabs, Inc) was used to block membranes for phosphorylated proteins, and the 4G10 Platinum anti-phosphotyrosine antibody (1:2000 dilution; Merck Millipore) was used to detect phosphorylated tyrosines. The immunoreactivity of phosphorylated isoforms of Dab1, GSK-3 and tau were normalized to total levels of the respective protein; α -tubulin (Sigma-Aldrich) also served as a loading control. A β peptide from the supernatant of cells were analyzed by 10% Tris-tricine SDS-PAGE and detected with the anti-human A β antibody 4G8 (1:4000 dilution; Covance Research). For blue-native gel electrophoresis, samples were not boiled and electrophoresis was performed as previously described [15], using NativeMark™ Unstained Protein Standards (Life Technologies) as molecular weight marker. The signal was visualized by ECL (GE Healthcare Life Science) and analyzed using Science Lab Image Gauge v 3.0 software (Fujifilm).

The anti-Reelin CR50 antibody (MBL Int. Corp.) was used at 15 μ l/ml and incubated for 1 h with media containing Reelin to neutralize its function.

Sucrose gradients

Reelin complexes were fractionated by ultracentrifugation at 150,000 \times g in a continuous sucrose gradient (5–20% w/v) for 18 hr at 4° C in a Beckman SW41 rotor. Brain extracts (~700 μ l) were carefully loaded onto the top of the gradient containing 10 ml of 0.5 M NaCl, 50 mM MgCl₂ and 0.5% (w/v) Triton X-100, in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). After centrifugation, the bottom of the tubes were punctured and 30–32 fractions were collected. Enzymes markers of known sedimentation coefficient (β -galactosidase, catalase and alkaline phosphatase) were used in the gradients to determine the approximate sedimentation coefficients.

Lectin binding analysis of Reelin

Aliquots of brain extracts and SH-SY5Y cell medium were mixed with 40 μ l of immobilized lectins Con A (lectin from *Canavalia ensiformis*) and LCA (lectin from *Lens culinaris agglutinin*, both from Sigma-Aldrich) that recognize mannosyl residues, with each lectin having subtle differences in their structure. Con A binds mannose, while LCA also interacts with α -mannosyl residues of N-linked sugar chains while also requiring the presence of a fucose residue bound to the C-6 hydroxyl group of the GlcNAc at the reducing end for strong binding [16]. The Reelin-lectin mixture was incubated overnight at 4° C with gentle mixing; unbound Reelin was separated by centrifugation and examined by Western blotting.

ApoER2-binding assay

Extracts from HEK-293 cells transfected with full-length mouse ApoER2 tagged with EGFP (gift from J. Nimpf) were

incubated with an anti-GFP antibody immobilised in Sepharose (Abcam) for 4 h. Immobilized ApoER2-GFP was then incubated overnight with Reelin-enriched supernatants from A β -treated SH-SY5Y cells. Bound proteins were washed and both bound and unbound fractions were subject to Western blot analysis.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Data were analyzed using SigmaStat (Version 2.0; SPSS Inc.) by Student's t-test (two tailed) or by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test for pair-wise comparisons. Statistical significance was designated as $p < 0.05$.

Results

Abnormal A β -Reelin fails to reduce tau phosphorylation

To assess the ability of altered Reelin expressed in presence of β -amyloid to activate its signaling cascade we used Reelin from an *in vitro* cell model. We have previously described that treatment of SH-SY5Y neuroblastoma cells with A β 42 influences Reelin expression and induces changes in Reelin glycosylation that resemble Reelin glycoforms observed in AD brain [11]. Secreted Reelin was collected from untransfected SH-SY5Y cells treated without (Cont-Reelin) or with A β 42 (A β -Reelin). Most of the soluble A β 42 oligomers were removed during the centrifugation and posterior filtration process, and only traces of the peptide were resolved in fractions of the Reelin enriched supernatant, after SDS-PAGE and Western blotting (Figure S1A). Alternatively, A β was further depleted by two cycles of immunoprecipitation with the antibody 6E10; as a result of this, traces of A β were undetectable (Figure S1A). To avoid differences in the amount of Reelin obtained from SH-SY5Y-treated cells, the 420 kDa band from Cont-Reelin and A β -Reelin was quantified by Western blots and equalized. We first corroborated that secreted Cont-Reelin and A β -Reelin display differences in glycosylation and have different binding affinities to Con A and LCA, as we previously found in Reelin from human brain extracts [11]. Alteration in Reelin glycosylation was demonstrated by a lectin-binding assay based on lectins that recognize mannosyl residues, but which have subtle differences in their structure [16]. Western blot analysis of the Con A unbound-protein fraction indicated higher affinity for secreted Cont-Reelin (a low Reelin immunoreactivity in the unbound fraction indicates high affinity for the lectin) than for A β -Reelin, whereas A β -Reelin displays higher affinity to LCA (Figure S1B).

Then, we determined if the changes in Reelin glycosylation by A β alter Reelin capacity to control tau phosphorylation. Mouse primary cortical cultures were treated with similar amounts of enriched Cont-Reelin or A β -Reelin preparations. Cont-Reelin decreases phosphorylation of tau, compared to non-treated neurons, whereas neurons treated with A β -Reelin leads to an increase in tau phosphorylation, estimated by the anti-phospho-tau antibodies AT8 (Ser²⁰²) and PHF13 (Ser³⁹⁶, an epitope phosphorylated by GSK3 β , see 17), (Figure 1). A β -Reelin obtained from SH-SY5Y cells treated with 1 μ M A β 42 also fails to reduce tau phosphorylation. Moreover, A β -Reelin

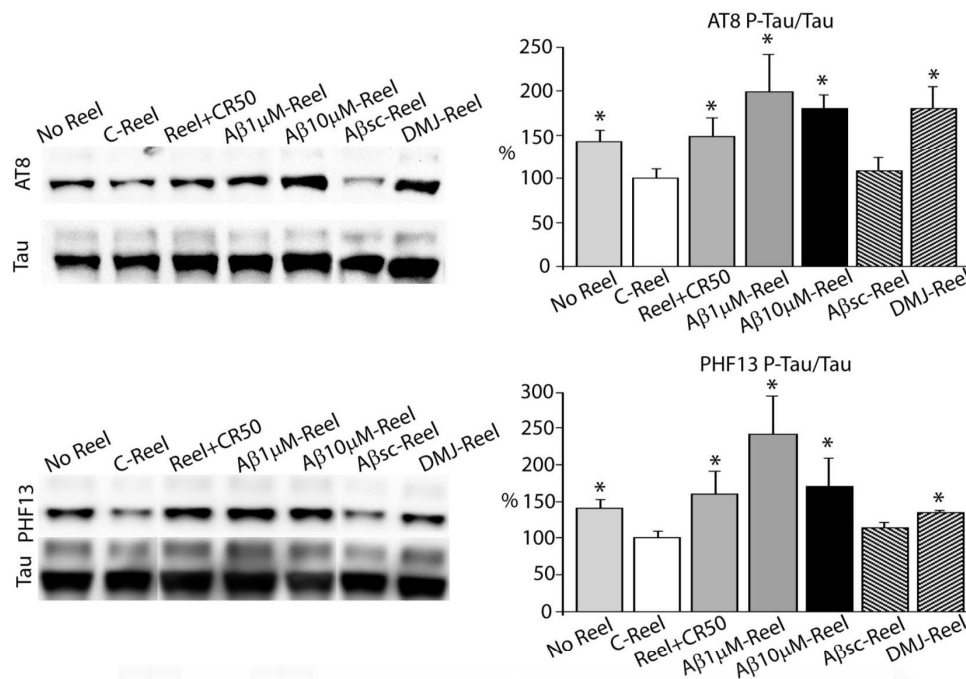


Figure 1. A β -Reelin fails to reduce tau phosphorylation. Levels of phospho-tau (P-tau; antibodies AT8 and PHF13) and total tau were calculated in primary mouse cortical neuron cultures treated with similar amounts of Reelin obtained from SH-SY5Y cells treated with 0 (control, C-Reel), 1 or 10 μ M of A β 42 (A β -Reel), or scrambled A β 42 peptide (A β sc-Reel; 10 μ M) (at least $n=6$, from 3 independent experiments). The comparison with non-treated cultures (No Reel) is also shown. In some experiments Cont-Reelin was pre-incubated with the antibody CR50 (15 μ g/ml) for 1 h prior to treatment ($n=3$). Neuronal cultures were also incubated with Reelin glycoforms obtained from SH-SY5Y cells treated with 0 (control, C-Reel) or 100 μ M of the mannosidase inhibitor DMJ (DMJ-Reel) ($n=6$, from 2 independent experiments). The data represent the percentages of variation (means \pm SEM) with respect to values determined for C-Reel treated cells. Data were analyzed using ANOVA analysis of variance, followed by Tukey test to compare all groups. *Significantly different ($p < 0.05$) from C-Reel treated cells.

doi: 10.1371/journal.pone.0072297.g001

from SH-SY5Y cells treated with 10 μ M A β 42 and obtained after immunodepletion of the A β peptide, also increases tau phosphorylation (not shown). The changes in tau phosphorylation driven by treatment with A β sc were similar to those detected in cells treated with Cont-Reelin. When neurons were treated with Reelin in the presence of the CR50, an anti-Reelin antibody which neutralizes Reelin [18,19], the phosphorylation levels of tau increases, confirming that the observed effects are Reelin dependent (Figure 1).

However, we cannot discard that undetectable traces of A β could affect directly tau phosphorylation in our cell system. To further confirm that changes in Reelin glycosylation can itself be responsible of impaired Reelin signaling, we employed also a different strategy to modify Reelin glycosylation. SH-SY5Y cells were treated with deoxymannojirimycin (DMJ), an inhibitor of endoplasmic reticulum mannosidases and Golgi mannosidase I. Neurons treated with altered Reelin glycoforms induced by DMJ also fail to reduce tau phosphorylation (Figure 1). These results confirm that altered Reelin glycosylation

compromises its biological role of modulating tau phosphorylation.

Reelin initiates a cytosolic kinase pathway which includes phosphorylation of the Dab1 protein and phosphorylation of GSK3 β at serine 9, which suppresses its activity, preventing hyperphosphorylation of tau [20]. Accordingly with the lack of modulation of tau phosphorylation, neurons treated with A β -Reelin show a decrease in phosphorylation of Dab1, as well as in phosphorylation of GSK3 β at serine 9 (Figure 2).

Involvement of the protein 14-3-3 in the A β -Reelin signaling

Tau and GSK3 β form a complex where 14-3-3, a phosphoserine binding protein, may play a role by acting as bridge between these proteins. The 14-3-3 protein enhances tau phosphorylation by GSK3 β favoring that GSK3 β phosphorylated at serine 9 remains active and phosphorylates tau [21,22]. We have observed that the levels of 14-3-3 are

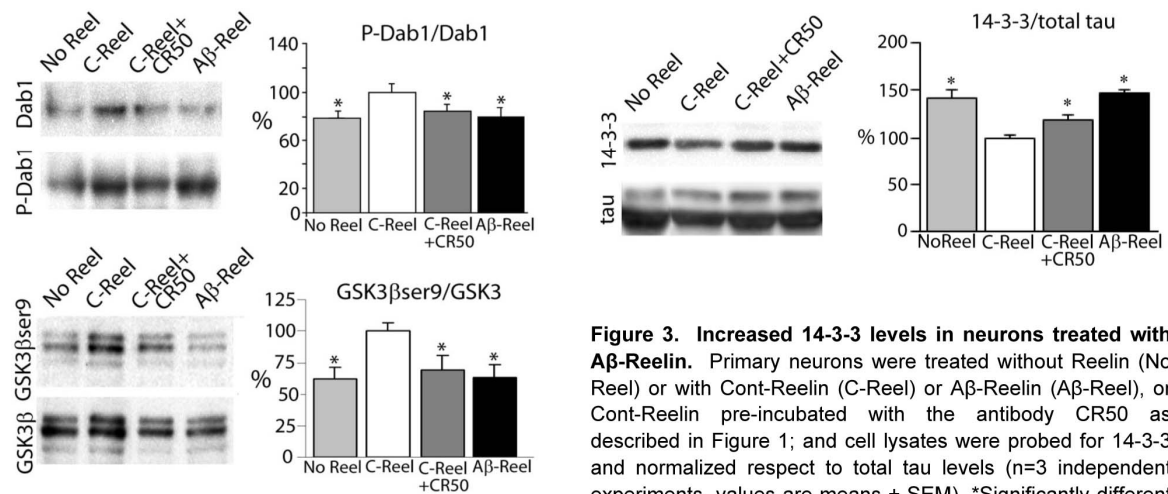


Figure 2. Aβ-Reelin fails to induce phosphorylation of Dab1 and GSK3β. Total cell lysates from primary mouse cortical neuron cultures treated without Reelin (No Reel) or with similar amounts of Reelin obtained from SH-SY5Y cells treated with 0 (control, C-Reel) or 10 μM of Aβ42 (Aβ-Reel) were probed with antibodies specific for total Dab1 and anti-phosphotyrosine Dab1 (P-Dab1), and GSK3β phosphorylated at serine 9 and total GSK3β. Levels of phosphorylated Dab1, GSK3β and tau were normalized to total Dab1, and GSK3β levels and tau respectively (n= 5 independent experiments for Dab1, GSK3β; n= 3 independent experiments for CR50). Data (means ± SEM) were analyzed using ANOVA analysis of variance, followed by Tukey test to compare all groups. *Significantly different ($p < 0.05$) from C-Reel treated cells.

doi: 10.1371/journal.pone.0072297.g002

significantly higher in cells treated with Aβ-Reelin compared to Cont-Reelin (Figure 3). Interestingly, neurons treated with Aβ-Reelin display similar 14-3-3 levels to those treated with the antibody CR50, which inhibits Reelin function. Our data indicate that 14-3-3 could be part of the Reelin signaling pathway, and suggests that this mechanism is also affected by the impaired Reelin signaling, and may contribute to the increment of tau phosphorylation.

Aβ-induced Reelin species fail to form physiologically active dimers and bind less efficiently to ApoER2

Reelin dimer formation is required for the full biological activity of the protein and to transduce its signaling [23,24]. Secreted disulfide-linked homodimer of Reelin are the forms found *in vivo* in brain and plasma [14,25,26]. Non-covalent (mainly electrostatic) interactions, also participate in the formation of functional Reelin dimers; but large complexes based only in electrostatic interactions fail to transduce signaling [24,25]. Thus, we next analyzed if the ability of Reelin to dimerize is affected when the protein is expressed in presence of Aβ. Supernatants containing Cont-Reelin or Aβ-

Figure 3. Increased 14-3-3 levels in neurons treated with Aβ-Reelin. Primary neurons were treated without Reelin (No Reel) or with Cont-Reelin (C-Reel) or Aβ-Reelin (Aβ-Reel), or Cont-Reelin pre-incubated with the antibody CR50 as described in Figure 1; and cell lysates were probed for 14-3-3 and normalized respect to total tau levels (n=3 independent experiments, values are means ± SEM). *Significantly different ($p < 0.05$) from C-Reel treated cells.

doi: 10.1371/journal.pone.0072297.g003

Reelin were prepared for Western blotting in the presence and absence of SDS and β-mercaptoethanol in the sample buffer during the denaturation step, and then, both the stacking and resolving gel were examined. When disulfide bonds were not reduced Cont-Reelin failed to enter the SDS-PAGE resolving gel and most material remained at the top of the stacking gel; while Aβ-Reelin was resolved as monomer bands of 420, 310 and 180 kDa (Figure 4A), indicating that Reelin present in AD brain may not have capacity to form covalent dimers. Previous studies have also used a cell adhesion assay to demonstrate Reelin homophilic interaction [25]. In our experiments, cells plated in dishes coated previously with Aβ-Reelin attach in a lesser number than when dishes are coated with Cont-Reelin, indicating an impaired homophilic interaction for abnormal Reelin (Figure S2). Altogether, these results indicate that covalent dimerization is impaired in Aβ-Reelin.

We also examined if failure of Reelin to form dimers affects its capacity to bind ApoER2. This Reelin-ApoER2 interaction was examined by an ApoER2 binding assay using recombinant ApoER2. While both Aβ-Reelin and Cont-Reelin were able to bind recombinant ApoER2, Aβ-Reelin had decreased binding capacity (Figure 4B).

Reelin from AD brain fails to form physiologically active dimers

While several studies have determined Reelin levels in AD brain and CSF, Reelin functionality has not been determined. Therefore, we examined Reelin isolated from the frontal cortex of AD subjects by blue native-PAGE to determine if these form homodimers or instead form larger inactive complexes. Complexes were extracted in assay buffer containing 0.5% DDM [27]. In ND (non-demented) brain extracts, as expected, a band was identified at ~450 kDa, representing the full-length protein, together with a high molecular mass band of ~800 kDa, probably corresponding to dimers of Reelin (Figure 5A). However, in the AD brain Reelin complexes appeared from

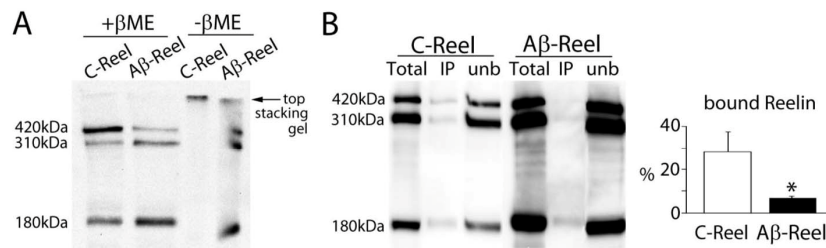


Figure 4. β -Amyloid compromises Reelin dimerization and affinity for ApoER2. (A) A β -induced Reelin cannot form covalent homodimers. Cont-Reelin or A β -Reelin glycoforms were denatured in the presence or absence of SDS/ β -mercaptoethanol (β ME) and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-Reelin antibody (representative blots from 4 different experiments are shown). (B) Immobilized ApoER2 was incubated with enriched soluble-Reelin supernatant obtained from untransfected SH-SY5Y cells treated with 0 (control, C-Reel) or 10 μ M Reelin (A β -Reel), and the precipitated protein (IP or bound) fractions were assessed by immunoblotting with an anti-Reelin antibody. The average percentage of the 420-kDa Reelin binding to immobilized ApoER2, expressed as mean \pm SEM of 4 independent determinations, is shown. Reelin which did not bind to ApoER2 (unb) is also shown. t-Test; * p < 0.05.

doi: 10.1371/journal.pone.0072297.g004

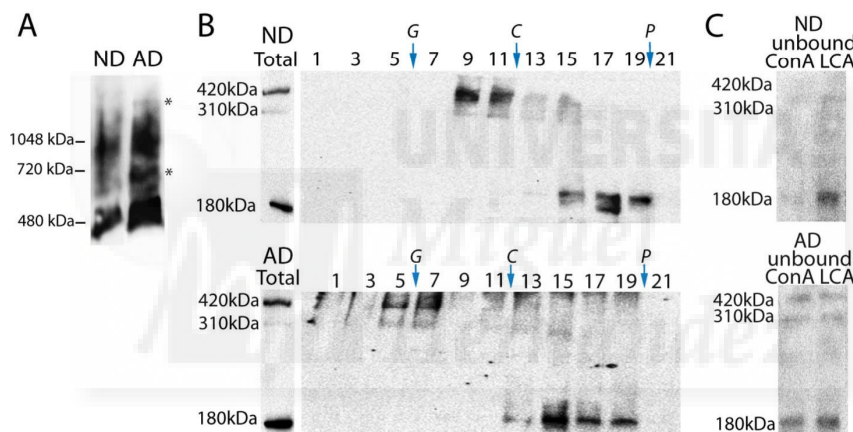


Figure 5. Reelin from AD cortex form large complexes. (A) Brain Reelin complexes from frontal cortex of ND and AD subjects (extracted in buffer containing 0.5% DDM) were analyzed by blue native-PAGE. * Asterisks indicate presence of intermediate and large Reelin complexes in AD samples. (B) Reelin extracted from frontal cortex of the same ND and AD subjects in presence of Triton X-100/Nonidet P-40 were applied to 5-20% sucrose density gradients (fractions were collected from the bottom of each tube). Aliquots from odd numbered fractions were immunoblotted for Reelin under denaturing conditions with the anti N-terminal Reelin antibody 142, which allows identification of the full-length 420 kDa Reelin and the two N-terminal 310 and 180-kDa fragments. Enzymes of known sedimentation coefficient, β -galactosidase (G, 16.0S; MW~ 540 kDa), catalase (C, 11.4S; MW~ 232 kDa) and alkaline phosphatase (P, 6.1S; MW ~ 140-160 kDa) were used as internal markers. (C) The same brain extracts were analyzed by lectin binding using Con A and LCA. The unbound Reelin glycoforms were determined by Western blotting (right panels). Representative cases from five independent experiments are shown.

doi: 10.1371/journal.pone.0072297.g005

~450 to ~1400 kDa, with several Reelin immunoreactive bands corresponding to intermediates and large complexes (Figure 5A).

The Reelin complexes were further characterized by sedimentation analysis. Triton X-100/Nonidet P-40 extracts from the frontal cortex of AD and ND subjects were also

fractionated on sucrose density gradients and resolved by Western blotted under denaturing conditions in order to characterize the full-length 420 kDa Reelin and the two N-terminal 310 and 180-kDa fragments. Reelin from AD extracts sediments in denser fractions than Reelin from ND extracts (Figure 5B). In the AD brain, Reelin forms complexes of higher

molecular mass than the functional homodimers present in the non-pathological condition, and this could lead to an impaired capacity to bind correctly to its receptor. We have previously demonstrated altered Reelin expression as the result of an altered glycosylation pattern of the protein in the AD frontal cortex [10,11]. We corroborated that Reelin glycoforms extracted from ND brain cortex bind strongly to Con A than to LCA (decreased Reelin immunoreactivity); whereas in AD samples Reelin glycoforms have similar or higher affinity for LCA compared to Con A (Figure 5C).

Discussion

Levels of Reelin in AD cortex have been analyzed due to its important role in modulation of synaptic transmission and tau hyperphosphorylation, both significantly altered in this disease. An efficient Reelin signaling cascade controls tau phosphorylation, thus a reduction in Reelin may favor progression of the disease. However, A β treatment elevates Reelin levels and alters its glycosylation [11]. The physiopathological significance of an increased expression of altered species of Reelin in affected brain regions from AD patients remains unclear; and evaluation of its levels by Western blotting or immunohistochemistry alone, will not determine the correct function of the protein. Our present results indicate that A β compromises Reelin biological function by altering binding affinities to its receptor. Therefore, in spite of potential increased levels of the protein, this Reelin should result nonfunctional and Reelin signaling ends impaired in the AD brain.

Our data indicate that Reelin present in AD brain it is not capable of forming active homodimers. The possibility that Reelin binds to itself was proposed [25], and demonstrated *in vivo* [14,26]. Indeed, covalent homodimers of Reelin are the functional units which interact with receptors [23]. The covalent bond could be via a unique cysteine residue in the central region of Reelin [24]. N-terminal Reelin fragments form large but unstable assemblies that do not induce efficient phosphorylation of Dab1 [26]. The sedimentation analysis demonstrates differences between Reelin species extracted from AD and ND brains. Changes in glycosylation characterized in Reelin extracted from AD brain may result in abnormal homophilic interaction of altered Reelin glycoforms forming inactive high molecular mass complexes. Changes in glycosylation may also affect Reelin/ApoER2 interactions.

Our data indicate that abnormal Reelin species, triggered by A β treatment, are inefficient in activating the signaling cascade and in controlling tau phosphorylation. Abnormal Reelin species fail to form active dimers and to bind properly to ApoER2. Interestingly, aberrant Reelin present in the AD brain form large complexes instead of dimers. Thus, abnormal Reelin species may interact with normal forms of the protein, possibly sequestering these to form oligomeric complexes but not physiologically active dimers (Figure 6). Therefore, despite an increase in the total amount of Reelin in the AD brain, less active Reelin may be available. We have also reported in the Tg2576 APP mice increased levels of Reelin [11]. In view of our present results the amount of active (dimers) and inactive

(large complexes) Reelin should be analyzed in this and others mice models of A β over-expression. Furthermore, an increase in abnormal Reelin would result in less activation of the Reelin signaling pathway and could contribute to the generation of a vicious cycle, where Reelin up-regulation may be driven by a chronic failure in Reelin signaling. Up-regulation of proteins in response to chronic inhibition is a recognized phenomenon documented for several proteins [28–30].

Alternative consequences for the lack of modulation of tau phosphorylation by A β -Reelin signaling have also been considered. We have demonstrated that neurons treated with A β -Reelin display an increase in the scaffold protein 14-3-3, a protein that only when is present maintains GSK3 β phosphorylated at serine 9 active and this phosphorylates tau [22]. Whether changes in 14-3-3 levels are part of a compensatory system of the complex tau-GSK3 β to regulate GSK3 β activity, or directly respond to Reelin signaling through ApoER2 or other receptors remain to be elucidated (Figure 6). Interestingly, it has been shown in platelets that 14-3-3 is translocated to the cytoskeleton after ApoER2 activation [31]. Moreover, Reelin coreceptors, members of the family of cadherin-related neuronal receptors (CNRs) [32] or integrins [33] have been proposed to be involved in the Reelin pathway; however it has also been demonstrated that Reelin binding to ApoER2 itself seems to be sufficient to transmit the signal and does not appear to require any other coreceptor [23]. However, we cannot exclude that such coreceptors participate in other cellular events induced by Reelin binding, including regulation of the 14-3-3 protein. Indeed, 14-3-3 levels can be modulated by integrins [34]. Furthermore, several isoforms of 14-3-3 have been found to be increased in the brains of patients with AD [35], and a recent proteomic approach confirms that 14-3-3 can be a disease-specific protein in AD [36]. Our data indicate that intracellular 14-3-3 levels are similar in cultures treated with either altered glycoforms of Reelin or with Reelin blocked by the CR50 antibody, demonstrating further that altered Reelin glycoforms may sequester active Reelin.

Our previous studies illustrated altered Reelin glycosylation in cells treated with A β using immobilized Con A and LCA and a LCA gel-shift assay [11]. Abnormal Reelin species also resemble Reelin detected in the AD brain in altered glycosylation pattern. We have no direct evidence that A β mediates changes in Reelin glycosylation compromise Reelin functionality, since it is likely that other cellular components are present in our Reelin-enriched fractions, and particularly A β . Similarly, we presume that oligomeric A β is the specie that affects the glycosylation of Reelin; however, under the conditions of our cellular experiments, we cannot differentiate if this effect is due to monomeric, oligomeric A β or fibers. Moreover, it is possible that A β itself adversely affects Reelin signaling (Figure 6). Further studies addressing the possibility that A β (monomers or oligomers) interacts directly with Reelin are warranted. Nonetheless, an impaired ability of Reelin to modulate tau phosphorylation was also exhibited by altered Reelin glycoforms induced by DMJ, an inhibitor of mannosidase. Thus, we favor the hypothesis that alterations in Reelin glycosylation affect the ability to form active dimers, bind the receptor and control the extent to which the tau protein is

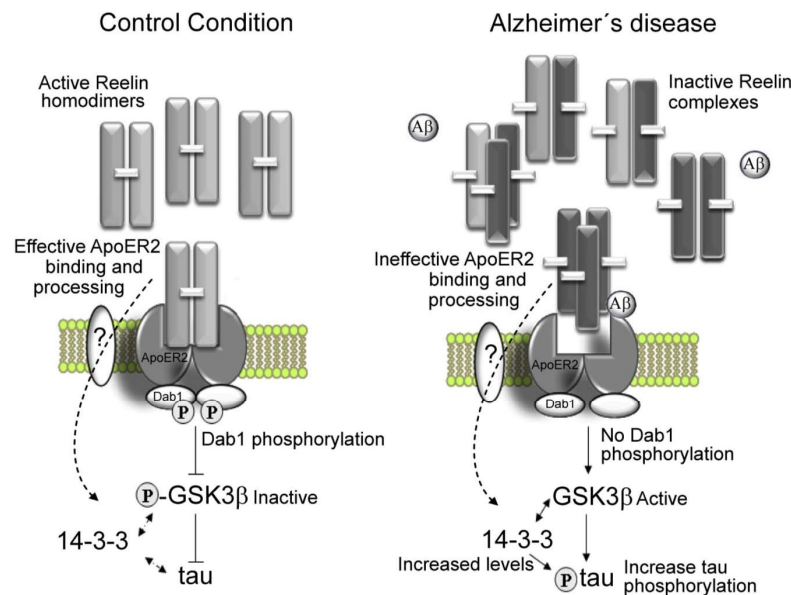


Figure 6. Schematic model of the impaired Reelin signaling in AD. β -Amyloid triggers changes in Reelin glycosylation impairing its ability to form active covalent homodimers. Accordingly, altered Reelin complexes display a reduced efficiency to bind the ApoER2 receptor, fail to induce efficient tyrosine phosphorylation of Dab1, and to transduce the signaling pathway that modulates tau phosphorylation by inhibition of GSK3 β . Soluble A β can also contribute to the impaired ability of Reelin to activate its signaling cascade. An imbalance in 14-3-3 levels is also triggered by the inefficient Reelin signaling.

doi: 10.1371/journal.pone.0072297.g006

phosphorylated. Discrete changes in the glycosylation profile of key brain proteins could have a critical impact in their function. Indeed, APP (the amyloid-precursor protein) glycosylation can modulate its metabolic turnover [37]. Glycosylation also modulates the function of β -secretase [38] and γ -secretase [39], and the processing of ApoER2 by γ -secretase [40]. In addition, glycosylation has been shown to play a role in modulating the hyperphosphorylation status of tau [41] and the maintenance of paired helical filaments [42]. The physiological relevance of the change in the glycosylation profile for key AD proteins including Reelin is clear; however the mechanism through which A β affects the glycosylation of Reelin warrants further study.

In conclusion, we present evidence of the abnormal dimerization of Reelin in the AD brain which suggests an altered signaling *in vivo*. We have shown that A β induces expression of abnormal (non physiologically efficient) Reelin species, resulting in impaired Reelin signaling. Our data associates A β and tau phosphorylation dysregulation through Reelin and raises the possibility that Reelin directly contributes to the progress of AD pathology.

Supporting Information

Figure S1. A β 42 induces changes in secreted Reelin from cultured cells.

(A) A β content was measured in the cell medium from non-treated (NT) or A β -treated SH-SY5Y cells before and after preparation procedures, and compared with the amount found in the pellet of the cell medium obtained before filtration. The A β was depleted of enriched Reelin fraction by filtration/concentration (filtration) and alternatively by ulterior immunoprecipitation (IP) with anti-A β antibody 6E10. There was a neglected amount of the peptide in Reelin enriched concentrates obtained from cell supernatants treated with 1 μ M A β 42 (blot not shown). Positions of the molecular-weight (MW) markers are shown. There was no significant cell death in cultures treated with 10 μ M A β 42, as evaluated by the MTS assay (13 \pm 5% reduction, p = 0.2), and only marginal cell death was estimated in cells treated with 10 μ M A β 42 (28 \pm 4% reduction, p = 0.008). (B) The glycosylation status of secreted Reelin from A β 42-treated SH-SY5Y cells was analyzed by a lectin-binding assay. Comparison of the pattern of unbound Reelin to Con A or LCA are shown from representative cases of Cont-Reelin (C-Reel) and A β -Reelin (A β -Reel) (representative cases from 4 independent experiments are shown). (TIF)

Figure S2. Impaired Reelin-mediated capacity of A β -Reelin.

Representative photographs of cells attached to a well coated coated without Reelin (No Reel) or with Cont-Reelin (C-Reel),

A β -Reelin (A β -Reel) or Cont-Reelin preincubated with CR50 antibody. The histogram shows the number of cells in each case normalized to Cont-Reelin, which was scored as 100 (n=5 independent experiments, values are means \pm SEM). t-Test * p < 0.05, ** p < 0.01. (TIF)

Acknowledgements

We thank Prof. J. Nimpf (Department of Medical Biochemistry, Max F Perutz Laboratories, Medical University Vienna, Austria), for generously providing cDNAs and antibodies.

References

- Rice DS, Curran T (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24: 1005-1039. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1005. PubMed: 11520926.
- Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4: 496-505. doi:10.1038/nrn1113. PubMed: 12778121.
- Herz J, Chen Y (2006) Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7: 850-859. doi:10.1038/nrn2009. PubMed: 17053810.
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC et al. (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24: 481-489. doi:10.1016/S0896-6273(00)80861-2. PubMed: 10571241.
- Brich J, Shie FS, Howell BW, Li R, Tus K et al. (2003) Genetic modulation of tau phosphorylation in the mouse. *J Neurosci* 23: 187-192. PubMed: 12514215.
- Kocherhans S, Madhusudan A, Doehner J, Breu KS, Nitsch RM et al. (2010) Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 30: 9228-9240. doi:10.1523/JNEUROSCI.0418-10.2010. PubMed: 20610758.
- Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ et al. (2007) Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27: 2727-2733. doi:10.1523/JNEUROSCI.3758-06.2007. PubMed: 17360894.
- Hoe HS, Lee KJ, Carney RS, Lee J, Markova A et al. (2009) Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 29: 7459-7473. doi:10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009. PubMed: 19515914.
- Sáez-Valero J, Costell M, Sjögren M, Andreassen N, Blennow K et al. (2003) Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 72: 132-136. doi:10.1002/jnr.10554. PubMed: 12645087.
- Botella-López A, Burgaya F, Gavín R, García-Ayllón MS, Gómez-Tortosa E et al. (2006) Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5573-5578. doi:10.1073/pnas.0601279103. PubMed: 16567613.
- Botella-López A, Cuchillo-Ibáñez I, Cotrufo T, Mok SS, Li QX et al. (2010) Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37: 682-691. doi:10.1016/j.nbd.2009.12.006. PubMed: 20025970.
- Kramer PL, Xu H, Woltjer RL, Westaway SK, Clark D et al. (2011) Alzheimer disease pathology in cognitively healthy elderly: a genome-wide study. *Neurobiol Aging* 32: 2113-2122. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.010. PubMed: 20452100.
- Santa-Maria I, Avila J, Rabano A (2010) Differential gene expression analysis of human entorhinal cortex support a possible role of some extracellular matrix proteins in the onset of Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 468: 225-228. doi:10.1016/j.neulet.2009.11.002. PubMed: 19922771.
- Lugli G, Krueger JM, Davis JM, Persico AM, Keller F et al. (2003) Methodological factors influencing measurement and processing of plasma reelin in humans. *BMC Biochem* 4: 9. doi:10.1186/1471-2091-4-9. PubMed: 12959647.
- Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199: 223-231. doi:10.1016/0003-2697(91)90094-A. PubMed: 1812789.
- Kornfeld K, Reitman ML, Kornfeld R (1981) The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. *J Biol Chem* 256: 6633-6640. PubMed: 7240233.
- Michel G, Mercken M, Murayama M, Noguchi K, Ishiguro K et al. (1998) Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim Biophys Acta* 1380: 177-182. doi:10.1016/S0304-4165(97)00139-6. PubMed: 9565682.
- D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K et al. (1997) Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci* 17: 23-31. PubMed: 8987733.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M et al. (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14: 899-912. doi:10.1016/0896-6273(95)90329-1. PubMed: 7748558.
- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 296: 15-19. PubMed: 8250835.
- Agarwal-Mawal A, Qureshi HY, Cafferty PW, Yuan Z, Han D et al. (2003) 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem* 278: 12722-12728. doi:10.1074/jbc.M211491200. PubMed: 12551948.
- Yuan Z, Agarwal-Mawal A, Paudel HK (2004) 14-3-3 binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser9-phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta in the brain. *J Biol Chem* 279: 26105-26114. doi:10.1074/jbc.M308298200. PubMed: 15073173.
- Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock HH et al. (2004) Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol Cell Biol* 24: 1378-1386. doi:10.1128/MCB.24.3.1378-1386.2004. PubMed: 14729980.
- Yasui N, Kitago Y, Beppu A, Kohno T, Morishita S et al. (2011) Functional importance of covalent homodimer of reelin protein linked via its central region. *J Biol Chem* 286: 35247-35256. doi:10.1074/jbc.M111.242719. PubMed: 21844191.
- Utsunomiya-Tate N, Kubo K, Tate S, Kainosho M, Katayama E et al. (2000) Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9729-9734. doi:10.1073/pnas.160272497. PubMed: 10920200.
- Kubo K, Mikoshiba K, Nakajima K (2002) Secreted Reelin molecules form homodimers. *Neurosci Res* 43: 381-388. doi:10.1016/S0168-0102(02)00068-8. PubMed: 12135781.
- Nyabi O, Bentahir M, Horré K, Herremans A, Gottardi-Littell N et al. (2003) Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin. *J Biol Chem* 278(44): 43430-43436. doi:10.1074/jbc.M306957200. PubMed: 12885769.
- Xu L, Kappler CS, Mani SK, Shepherd NR, Renaud L et al. (2009) Chronic administration of KB-R7943 induces up-regulation of cardiac NCX1. *J Biol Chem* 284: 27265-27272. doi:10.1074/jbc.M109.022855. PubMed: 19661061.
- Serfözö Z, Lontay B, Kukor Z, Erdődi F (2012) Chronic inhibition of nitric oxide synthase activity by N(G)-nitro-L-arginine induces nitric oxide synthase expression in the developing rat cerebellum. *Neurochem Int* 60: 605-615. doi:10.1016/j.neuint.2012.02.019. PubMed: 22391324.

30. García-Ayllón MS, Silveyra MX, Andreasen N, Brimijoin S, Blennow K et al. (2007) Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase changes after treatment with donepezil in patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 101: 1701-1711. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04461.x. PubMed: 17326766.
31. Pennings MT, Derksen RH, van Lummel M, Adelmeijer J, VanHoorelbeke K et al. (2007) Platelet adhesion to dimeric beta-glycoprotein I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein Ibalpha and apolipoprotein E receptor 2. *J Thromb Haemost* 5: 369-377. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02310.x. PubMed: 17096706.
32. Senzaki K, Ogawa M, Yagi T (1999) Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* 99: 635-647. doi:10.1016/S0092-8674(00)81552-4. PubMed: 10612399.
33. Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B et al. (2000) Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27: 33-44. doi:10.1016/S0896-6273(00)00007-6. PubMed: 10939329.
34. Melander F, Andersson T, Dib K (2004) Engagement of beta2 integrins recruits 14-3-3 proteins to c-Cbl in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 1000-1005. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.147. PubMed: 15094368.
35. Fountoulakis M, Cairns N, Lubec G (1999) Increased levels of 14-3-3 gamma and epsilon proteins in brain of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 57: 323-335. PubMed: 10666687.
36. Gozal YM, Duong DM, Gearing M, Cheng D, Hanfelt JJ et al. (2009) Proteomics analysis reveals novel components in the detergent-insoluble subproteome in Alzheimer's disease. *J Proteome Res* 8: 5069-5079. doi:10.1021/pr900474t. PubMed: 19746990.
37. Nakagawa K, Kitazume S, Oka R, Maruyama K, Saido TC et al. (2006) Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptides. *J Neurochem* 96: 924-933. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03595.x. PubMed: 16412100.
38. Sidera C, Parsons R, Austen B (2005) Post-translational processing of beta-secretase in Alzheimer's disease. *Proteomics* 5: 1533-1543. doi:10.1002/pmic.200401185. PubMed: 15789346.
39. Yang DS, Tandon A, Chen F, Yu G, Yu H et al. (2002) Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem* 277: 28135-28142. doi:10.1074/jbc.M110871200. PubMed: 12032140.
40. May P, Bock HH, Nimpf J, Herz J (2003) Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by gamma-secretase. *J Biol Chem* 278: 37386-37392. doi:10.1074/jbc.M305858200. PubMed: 12871934.
41. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX (2004) O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10804-10809. doi:10.1073/pnas.0400348101. PubMed: 15249677.
42. Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2: 871-875. doi:10.1038/nm0896-871. PubMed: 8705855.



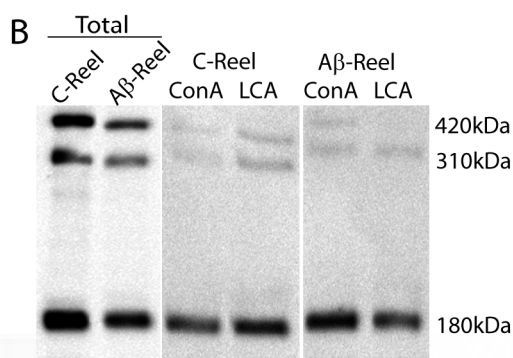
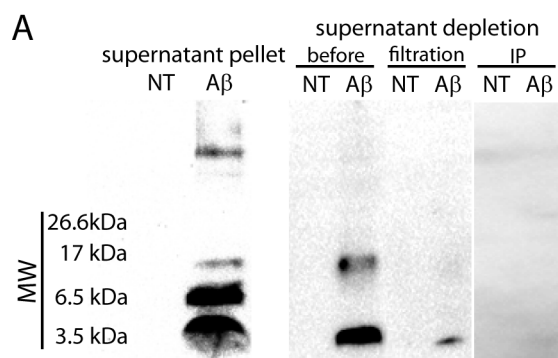


Fig. S1

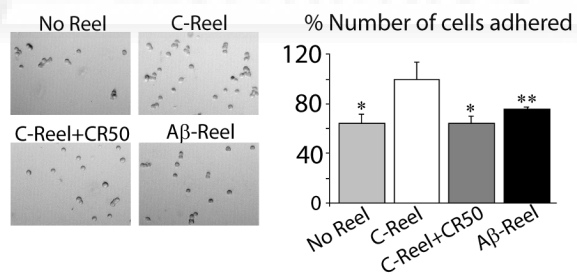


Fig. S2

OBJETIVO 2. “El procesamiento del receptor de la reelina, ApoER2, mediado por la γ -secretasa está implicado en la expresión de la propia reelina”

Balmaceda V, Cuchillo-Ibáñez I, Pujadas L, García-Ayllón MS, Saura CA, Nimpf J, Soriano E, Sáez-Valero J. ApoER2 processing by presenilin-1 modulates reelin expresión. *FASEB J.*, 2013; doi:10.1096/fj.13-239350fj.13-239350

Sinopsis:

La transducción celular de la reelina comienza con la unión a su receptor ApoER2, una proteína de transmembrana tipo I perteneciente a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad. La unión de la reelina induce el procesamiento secuencial del ApoER2, que está mediado por la α -secretasa y la γ -secretasa, enzimas que también ejecutan el procesamiento del precursor amiloide APP y de otras proteínas de transmembrana tipo I. El procesamiento proteolítico de esta familia de receptores no sólo controla la presencia del receptor en la superficie celular, sino que también tiene la capacidad de modular diversos procesos celulares involucrados en la transcripción genética. En este trabajo hemos observado que la actividad proteolítica de la γ -secretasa sobre el receptor ApoER2 también afecta a los niveles transcripcionales y proteicos de la propia reelina. En el cerebro de ratones *knock-out* de PS1, la subunidad catalítica de la γ -secretasa que genera un fragmento intracelular del ApoER2, hemos detectado un aumento en la expresión de la reelina. El uso de una línea celular neuronal nos ha permitido modular *in vitro* los niveles de la reelina, tanto por la inhibición farmacológica de la actividad γ -secretasa, como también, mediante la sobreexpresión del receptor ApoER2. Atribuimos que dicha modulación se debe no sólo al propio procesamiento por endocitosis de receptor y ligando, el cual ocurre tras la unión de la reelina, sino también a mecanismos que suceden a nivel genético.

Hemos detectado la presencia del fragmento intracelular del ApoER2, producto del corte de la γ -secretasa, en el núcleo celular donde interacciona de forma directa con la región promotora del gen de la reelina. Empleando un sistema reportero acoplado al promotor de la reelina, hemos observado que el fragmento intracelular del ApoER2 es capaz de modular la expresión de dicho promotor. Consecuentemente, el tratamiento de los cultivos celulares con un inhibidor de la actividad γ -secretasa disminuye los niveles del fragmento

intracelular del ApoER2 en el núcleo celular e incrementa la actividad del sistema reportero. Estos resultados nos revelan un mecanismo que regula expresión de la reelina en donde interviene la actividad proteolítica de la γ -secretasa. La auto-regulación de la reelina mediada por el procesamiento del ApoER2 no había sido estudiada hasta la fecha, ya que casi siempre se había considerado el efecto biológico de la reelina sobre células distintas a aquellas que la secretan. Este efecto auto-regulador aparece como un mecanismo biológico que puede intervenir en procesos neuronales que están modulados por la señal de la reelina en el cerebro.



The FASEB Journal article fj.13-239350. Published online December 16, 2013.

The FASEB Journal • Research Communication

ApoER2 processing by presenilin-1 modulates reelin expression

Valeria Balmaceda,^{*,†} Inmaculada Cuchillo-Ibáñez,^{*,†} Lluís Pujadas,^{†,‡,§} María-Salud García-Ayllón,^{*,†,||} Carlos A. Saura,^{†,||} Johannes Nimpf,[#] Eduardo Soriano,^{†,‡,§} and Javier Sáez-Valero^{*,†,||}

^{*}Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández–Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sant Joan d'Alacant, Spain; [†]Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain; [‡]Institut de Recerca Biomèdica (IRB)-Barcelona, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain; [§]Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ^{||}Unidad de Investigación, Hospital General Universitario de Elche, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO), Elche, Spain; [¶]Institut de Neurociències, Departament Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; and [#]Max F. Perutz Laboratories, Department of Medical Biochemistry, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

ABSTRACT The reelin signaling protein and its downstream components have been associated with synaptic plasticity and neurotransmission. The reelin signaling pathway begins with the binding of reelin to the transmembrane lipoprotein receptor apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2), which in turn induces the sequential cleavage of ApoER2 by the sequential action of α - and γ -secretases. Using conditional-knockout mice of the catalytic component of the γ -secretase complex, presenilin 1 (PS1), we demonstrated increased brain ApoER2 and reelin protein and transcript levels, with no changes in the number of reelin-positive cells. Using the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line, we showed that ApoER2 processing occurs in the presence of PS1, producing an intracellular ApoER2 C-terminal fragment. In addition, the pharmacologic inhibition of γ -secretase in SH-SY5Y cells led to increased reelin levels. Overexpression of ApoER2 decreased reelin mRNA levels in these cells. A luciferase reporter gene assay and nuclear fractionation confirmed that increased amounts of intracellular fragment of ApoER2 suppressed reelin expression at a transcriptional level. Chromatin immunoprecipitation experiments corroborated that the intracellular fragment of ApoER2 bound to the *RELN* promoter region. Our study suggests that PS1/ γ -secretase-dependent processing of the reelin receptor ApoER2 inhibits

reelin expression and may regulate its signaling.—Balmaceda, V., Cuchillo-Ibáñez, I., Pujadas, L., García-Ayllón, M.-S., Saura, C. A., Nimpf, J., Soriano, E., Sáez-Valero, J. ApoER2 processing by presenilin-1 modulates reelin expression. *FASEB J.* 28, 000–000 (2014). www.fasebj.org

Key Words: transcription • Alzheimer's disease • Reelin

REELIN IS A LARGE SIGNALING protein that plays an important role in the adult brain, influencing neurotransmission and synaptic plasticity, thereby favoring memory formation. Indeed, normal reelin levels are essential for some forms of long-term memory (1–3). The reelin signaling pathway is initiated by binding of reelin to transmembrane lipoprotein receptors: the apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and/or the very low density lipoprotein receptor (VLDLR; refs. 4, 5). Binding of reelin to its receptor relays the signal into the cell via the adapter Disabled 1 (Dab1; refs. 6–8). Reelin-dependent induction of Dab1 tyrosine phosphorylation triggers an intracellular kinase cascade that includes the activation of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway and that ultimately inhibits glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), preventing hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein tau (9).

Disruption of reelin, Dab1, or both ApoER2 and VLDLR leads to similar anatomic alterations during brain development, resulting in a *reeler* phenotype (8, 10, 11). Downstream consequences of an impaired reelin signaling pathway are well established during brain development and become clearer in the adult

Abbreviations: A β , β -amyloid; AcH2B, acetylated histone H2B; AD, Alzheimer's disease; ApoER2, apolipoprotein E receptor 2; APP, β -amyloid precursor protein; cDKO, conditional double knockout; ChIP, chromatin immunoprecipitation; cKO, conditional knockout; CTF, C-terminal fragment; Dab1, Disabled-1; DAPT, *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*l*-alanine]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester; DMSO, dimethyl sulfoxide; ICD, intracellular domain; MTS, tetrazolium; NGS, normal goat serum; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; PF, paraformaldehyde; PS1, presenilin 1; VLDLR, very low density lipoprotein receptor

¹ Correspondence: Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Av. Ramón y Cajal s/n, E-03550 Sant Joan d'Alacant, Spain. E-mail: j.saez@umh.es
doi: 10.1096/fj.13-239350

(12). Afterward, it is important to determine the mechanisms of modulation and regulation of reelin signaling, including putative autoregulatory mechanisms, which control the expression and function of the reelin protein level in normal and pathological conditions. In this context, both reelin and ApoER2-soluble fragments, resulting from proteolysis during receptor activation, may represent a putative autoregulatory mechanism by directly interfering in the binding of reelin to its receptor (13–17).

In this study, we investigated whether modulation of ApoER2, the major reelin receptor in the brain, influences reelin expression. We also studied the role of presenilin 1 (PS1), the active proteolytic component of the γ -secretase complex (18), in this modulation, in that ApoER2 cleavage after its binding to reelin is mediated by the sequential processing of the proteolytic enzymes α - and γ -secretases (19–21). Finally, we studied the transcriptional activity of the intracellular domain (ICD) fragment, generated by the process of the ApoER2 C-terminal fragment (CTF) by γ -secretase.

MATERIALS AND METHODS

PS1 conditional-knockout (*PS1* cKO) mice

Generation and characterization of the *PS1* cKO mice have been previously described (22). *PS1* conditional double-knockout (cDKO) mice lack expression of *PS1* gene in glutamatergic neurons of the forebrain in the postnatal stage starting around P18. *PS1* cDKO mice (*fPS1/fPS1*;CaMKII α -Cre) were obtained by crossing floxed *PS1* (*fPS1/fPS1*) males to *PS1* cKO females (*fPS1/fPS1*;CaMKII α -Cre). Mice used in this study were age-matched littermate control (*fPS1/fPS1*) and *PS1* cDKO (*fPS1/fPS1*; CaMKII α -Cre) mice (C57BL/6 background). Experimental procedures were conducted according to the Animal and Human Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona (protocol CEEAH 475), according to European Union guidelines.

Brain samples were collected from 3- to 4-mo-old *PS1* cKO ($n=10$) and age-matched control littermates ($n=10$). No PS1 was detectable in the forebrain glutamatergic neurons of 2- to 3-mo-old mice, and no significant alterations in general behavior, motor coordination, and exploratory anxiety were observed. Brain cytoarchitecture, the number of neurons, and morphology were also normal (22, 23).

Pharmacologic treatment of cells with the γ -secretase inhibitor DAPT

SH-SY5Y cells (2.2×10^5 cells/well) were grown on 12-well plates for 24 h in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus GlutaMAX (Life Technologies, Inc., Paisley, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 100 μ g/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies). The cells were treated with 5 μ M γ -secretase inhibitor *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester (DAPT; Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) or the dimethyl sulfoxide (DMSO) vehicle. After 22 h of treatment, the cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 100 μ l of ice-cold extraction buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (w/v) Nonidet P-40, and 0.5% (w/v) Triton X-100, supplemented with a cocktail of protease

inhibitors. The cell lysates were sonicated and centrifuged at 20,000 *g* at 4°C for 12 min, and extracts were frozen at -80°C for future analysis. Alternatively, for analysis of the effect of DAPT on reelin transcriptional activity, HEK293 cells were used.

Cell viability was measured using the tetrazolium (MTS) assay (CellTiter 96 A_{Queous} Assay; Promega, Southampton, UK) according to the manufacturer's instructions. SH-SY5Y cells were cultured in 96-well plates (1.9×10^4 cells/well) and treated with DAPT, as described previously. MTS was added after DAPT treatment and the cells were incubated for 4 h before viability was determined by measuring the absorbance at 490 nm in a microplate reader (Infinite M200; Tecan, Männedorf, Switzerland).

ApoER2 and PS1 overexpression and luciferase reporter assay

SH-SY5Y cells were transfected with a construct encoding full-length ApoER2 (pEGFPN1-*Mus musculus* ApoER2). Alternative ApoER2 constructs were also used: ApoER2-myc, expressing the transmembrane and cytoplasmic domains (aa 825–963), and ApoER2-HA, expressing only the cytoplasmic domain (aa 728–842) (both generously provided by Dr. W. Rebeck, Georgetown University Medical Center, Washington, D.C., USA; see refs. 24, 25). Alternatively, SH-SY5Y cells were transfected with a construct encoding human full-length PS1 (26). Empty vectors (Promega) were used as the control. Cells (6.5×10^5 cells/well) were grown in 6-well plates and transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. After 2 days in culture, the cells and culture supernatants were separately harvested. The cell culture supernatants were cleared by centrifugation for 10 min, 5000 *g* at 4°C. The cells were extracted as described previously, and ApoER2 levels were assayed by Western blot to determine transfection efficiency.

For the luciferase reporter assay, the SH-SY5Y cells were transfected with a pGL3 Basic Vector-*RELN* promoter (–2600 region, which contains 2.6 kb of the 5' flanking sequence of the human *RELN* promoter; a kind gift from Dr. D. Grayson, University of Illinois, Chicago, IL, USA; see ref. 27) in the presence of ApoER2-pEGFP or a pEGFP empty vector. cDNA (2–4 μ g) was cotransfected with 10–30 ng of the pRL-CMV vector (*Renilla* luciferase; Promega) in each well of a 12-well plate (2×10^5 cells/well). Alternatively, some luciferase reporter assays were performed in HEK293 cells. Firefly and *Renilla* luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Cell lysates were prepared 36 h after transfection using Passive Lysis Buffer (Promega), and aliquots (~ 20 μ l) were used to determine luciferase activity in a SIRUS Luminometer (Titertek-Berthold; Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Germany). Firefly luciferase data were normalized to *Renilla* luciferase activity.

Nuclear protein fractionation

SH-SY5Y cells were cultured in 10 cm² culture plates (4×10^6 cells/plate). At 36 h after transfection with ApoER2-pEGFP or the pEGFP empty vector, the cells were washed twice with cold PBS and gently scraped off the plates with 10 ml of cold PBS. Cell debris was discarded by centrifugation for 5 min at 500 *g*, 4°C. Cell lysis and isolation of cellular nuclei were performed with the QProteome Nuclear Protein kit (Qiagen, Crawley, UK), according to the manufacturer's instructions. Cytosolic and nuclear protein fractions were assayed by Western blot.

Western blot analysis

Reelin levels were determined as described elsewhere (28, 29). Brain extracts (30 µg), SH-SY5Y cell extracts (30 µg), or cell culture media (~30 µl) were boiled for 3 min, then resolved on 6% polyacrylamide slab gels. Total protein concentration was determined by the bicinchoninic assay (BCA; Pierce-ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Electrophoresis was allowed to proceed at low voltage, to minimize excessive heat generation (28, 30). Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes, blocked with 5% nonfat milk, and incubated with the monoclonal mouse anti-reelin antibodies 142 (1:1000 dilution; Chemicon International, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for SH-SY5Y samples and G10 (1:500 dilution; Chemicon) for mouse samples. These antibodies recognize epitopes located in the region of aa 164–189 (clone 142) and 164–496 (clone G10) (31).

To detect ApoER2, brain and cell extracts were boiled for 7 min at 98°C, and full-length and CTFs of ApoER2 were resolved on 6 and 10% polyacrylamide gels, respectively. A rabbit polyclonal antibody to ApoER2 (1:1000 dilution; Abcam, Cambridge, UK), raised to a synthetic peptide corresponding to aa 928–945 located near the C terminus of ApoER2, was used to detect the ApoER2 and CTFs. The β -amyloid precursor protein (APP)-CTF was analyzed by 10% Tris-tricine SDS-PAGE and detected with a polyclonal rabbit anti-C-terminal antibody (1:5000 dilution; Sigma-Aldrich, Poole, UK). Rabbit polyclonal antibodies anti-HA (1:3000 dilution), anti-myc (1:3000 dilution; Sigma-Aldrich), and mouse anti-GFP (1:3000 dilution; Abcam) were also used. The loading control was estimated with mouse α -tubulin (1:5000 dilution; Sigma-Aldrich). A polyclonal antibody against acetylated histone H2B [AcH2B; 1:5000 dilution; generous gift from Dr. A. Barco, Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández–Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sant Joan d'Alacant, Spain] was used to characterize the nuclear fraction. Individual Western blots were used for each antibody, to avoid stripping of immunoblots and hence loss of signal. Immunoblots were developed with enhanced chemiluminescence (ECL) by SuperSignal (Pierce-ThermoScientific) in a Luminescent Image Analyzer LAS-1000 Plus (Fujifilm, Tokyo, Japan). The intensity of the reelin bands was measured by densitometry with the Science Lab Image Gauge 4.0 software provided by Fujifilm.

Immunohistochemistry and immunocytochemistry

Animals were anesthetized and perfused for 20 min with 0.1 M phosphate buffer (PB) containing 4% paraformaldehyde (PF). The brains were removed, postfixed overnight with PB-4% PF, cryoprotected with PB containing 30% sucrose, and frozen. They were then sectioned coronally at a thickness of 30 µm, and tissue sections were collected in series of 10 sections and maintained at –20°C in PB containing 30% glycerol and 30% ethylene glycol. Nuclei were detected by using Nissl staining. For immunohistochemistry, the sections were blocked for 2 h at room temperature with PBS containing 10% normal goat serum (NGS), 0.2% gelatin, and an F(ab')₂ fragment of anti-mouse IgG (1:300; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Reelin was detected by the antibody G10 (Chemicon). Sequential incubation with biotinylated secondary antibody (1:200; Dako, Carpinteria, CA, USA) and streptavidin-HRP (1:400; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) were performed in PBS-5% NGS. Bound antibodies were visualized by using diaminobenzidine (DAB) reagent and H₂O₂ as peroxidase substrates (Sigma-Aldrich), and the sections were dehydrated and mounted (Eukitt; EMS, Hatfield, PA, USA). To quantify the number of reelin-positive

cells in the cingulate and motor cortex (bregma +1.1/–0.5 mm; lateral \pm 1 mm), we counted every 10th section for each animal. Data were normalized to the area counted in 30-µm sections ($n=6$ sections/animal, 4 animals/group). Positively stained areas were quantified with ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

SH-SY5Y cells used for confocal microscopy were transfected with either ApoER2-pEGFP or a vector containing pEGFP alone with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. After 4 h, medium was replaced with fresh medium containing 5 µM DAPT, or the equivalent volume of DMSO as the control. After 24 h, the cells were washed with cold Hanks' buffered salt solution and fixed with methanol for 10 min at –20°C. Nonspecific sites were blocked with 2% (w/v) BSA and 40 µg/ml digitonin in PBS for 30 min. The cells were then incubated with primary antibodies (rabbit anti-GFP 1:100, Invitrogen; mouse anti-emerin 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; mouse anti-N cadherin 1:200, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 1 h followed by secondary antibodies (Alexa Fluor 546 anti-mouse 1:200; Alexa Fluor 488 anti-rabbit 1:200; Invitrogen-Molecular Probes, Paisley, UK) for 1 h. To study the location of ApoER2-EGFP in the vicinity of the inner nuclear membrane, we incubated cells with cycloheximide (50 µM; Sigma-Aldrich) for 2 h after transfection and before immunocytochemistry, to block synthesis of new proteins. Micrographs were acquired with a Leica upright TCL-SL confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with an HCX Plan Apochromat $\times 63/1.32$ –0.6 NA oil objective (Leica). To measure the intensity of fluorescence of ApoER2-EGFP colocalizing with emerin, we drew a circle by hand over the green fluorescence that overlapped the red fluorescent nuclear membrane in the merged channel, and the fluorescence intensity was analyzed with LAS AF Lite software (Leica).

RNA isolation and real-time RT-PCR analysis

RNA was extracted from mouse brains and SH-SY5Y cells by TRIzol Reagent in the PureLink Microto-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. cDNAs were synthesized with SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, with 5 µg of total RNA and oligo (dT)_{12–18}. Quantitative PCR amplification was performed with a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Life Technologies) with *TaqMan* probes specific for mouse *RELN* (assay ID: Mm00465200_m1 and human *RELN* (assay ID: HS01022646_m1) and mouse and human *GAPDH* as endogenous controls (all from Applied Biosystems). Reelin transcript levels were normalized to *GAPDH*.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

SH-SY5Y cells plated in 100 mm tissue culture dishes (4.3×10^6 cells/plate) were transfected with 20 µg of ApoER2-HA, according to the protocol described above. After 36 h, the cells were fixed in freshly prepared 1% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Cross-linking was halted by the addition of 2.5 M glycine for 5 min. The cells were washed twice with ice-cold PBS plus protease inhibitors. The chromatin was extracted by using EZ Magna ChIP A/G (Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol.

The extracted chromatin was sheared to 100–500 bp with the Biorruptor (Diagenode Inc., Denville, NJ, USA) in 30 s cycles for 10 min. After centrifugation at 10,000 *g* at 4°C for 10 min, the supernatant was collected. For immunoprecipita-

tion, protein A/G magnetic beads (Millipore) were coupled to anti-HA-antibody (Abcam) or to rabbit IgG antibody as a control (Millipore). Supernatants were incubated overnight with the beads. Immunoprecipitates were incubated with proteinase K (Millipore) at 62°C for 2 h (Thermomixer system; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) to reverse formaldehyde cross-linking, and purified DNA was analyzed by PCR, using primers for human GAPDH as the control (Millipore). PCR amplification was performed with 30 ng of immunoprecipitated DNA in a 20 µl reaction volume containing 0.3 µM of sense and antisense primers, 10% v/v DMSO, and a KOD Hot Start DNA Polymerase kit (Novagen; Merck; 0.3 mM of each dNTP, 1× KOD polymerase buffer, 1.5 mM MgSO₄, and 1 U of KOD Hot Start DNA Polymerase). Primers were designed to amplify 5'UTR human *RELN* at different positions of the promoter: (−515 to −395 bp) sense 5'-CTCGCTCATTGAGTTTGGAG-3', antisense 5'-GGGGCTTTAAGAAGGTGTGG-3'; (−393 to −181 bp) sense 5'-CTCAGCGTCTCTCGACAG-3', antisense 5'-CCGCTCCACACCTTCTTAAA-3'; and (−191 to +110 bp) sense 5'-CTCAGCGTCTCTCGACAG-3', antisense 5'-CCGCTCCACACCTTCTTAAA-3'.

The assembly PCRs were performed by an initial denaturation of DNA at 95°C for 5 min. Cycling conditions were 32–35 cycles for 30 s 94°C, annealing at 61°C for 30 s, and 72°C for 30 s. A final extension period of 2 min at 72°C completed the thermocycling before cooling. PCR products were analyzed by gel electrophoresis on a 2% Tris acetate-EDTA (TAE) agarose gel.

Statistical analysis

All data were analyzed with SigmaStat 2.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) by using Student's *t* test (2-tailed) or by 1-way analysis of variance, followed by Bonferroni's *post hoc* test. Results are presented as means ± SE. Values of *P* < 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Reelin and ApoE receptor levels are altered in brains of *PS1* cKO mice

To determine whether *PS1* is involved in the control of reelin receptor levels *in vivo*, brain homogenates from *PS1* cKO mice (22) and littermate controls were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blot. Immunoblot analysis for the main brain reelin receptor, ApoER2, revealed a complex banding pattern, probably reflecting the several ApoER2 isoforms (32) and the mature and precursor forms (21, 33). The levels of ApoER2 appeared to be significantly increased in cortical extracts (hemisector) from the *PS1* cKO mice (~80% increase; *P*=0.03) compared with the control animals (Fig. 1A). It is known that reelin bound to ApoER2 induces subsequent ApoER2 cleavage by the sequential action of α- and γ-secretases (19, 20). α-Secretase cleaves the ApoER2 extracellular domain, generating a membrane-bound CTF that subsequently acts as a substrate for γ-secretase. Consistent with the role of *PS1* in the proteolysis of ApoER2, we found a significant accumulation of ApoER2-CTF in cortical extracts from the *PS1* cKO mice (~300% increase; *P*<0.001) compared with the control littermates (Fig. 1A). Levels of ApoER2 in the cerebellum, a region in which *PS1* is not silenced, did not differ between the *PS1* cKO mice and the littermate controls.

We next measured the levels of the ApoER2 ligand reelin and found that full-length reelin (420 kDa) displayed a large increase in the cortices of the *PS1* cKO

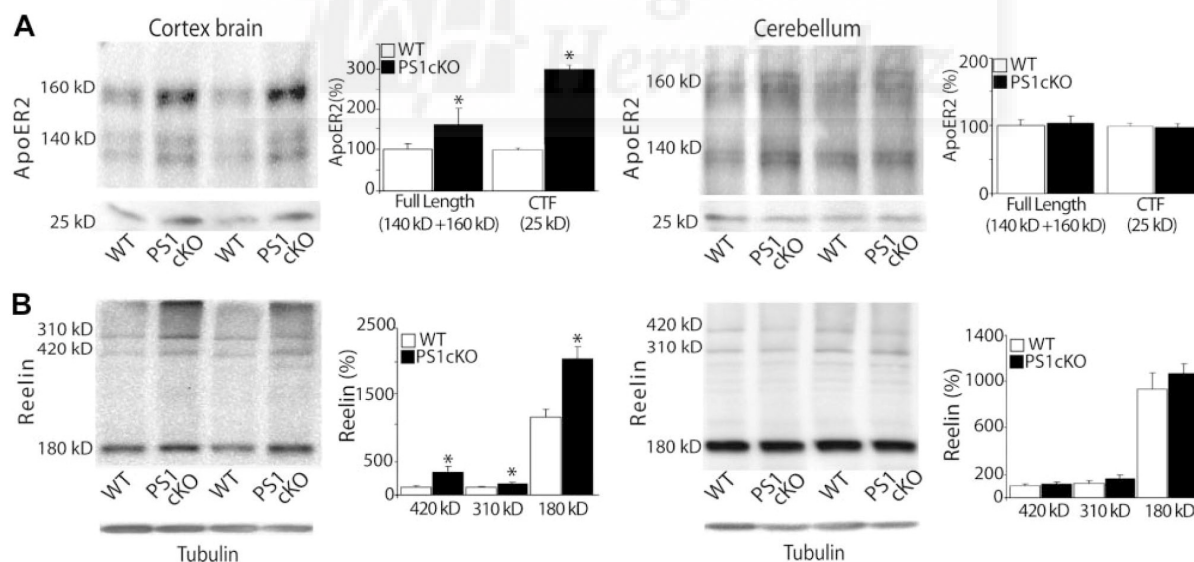


Figure 1. Increased levels of ApoER2 and reelin in the cortex of *PS1* cKO mice. **A)** Representative blot for immunodetection of ApoER2 full-length isoforms and CTF in the cortex (hemisector; left) and the cerebellum (right) of control wild-type (WT) and *PS1* cKO mice (*n*=6 each). Densitometric quantification from the sum of all the bands close to 160 and 140 kDa and of the 25-kDa CTF band are shown. **B)** Western blots and densitometric quantification of reelin fragments from the WT and *PS1* cKO samples presented in A. The N-terminal reelin antibody G10 detects full-length 420-kDa reelin and the N-terminal 310- and 180-kDa fragments. Reelin immunoreactivity from each fragment is shown and expressed as a percentage relative to immunoreactivity of the 420-kDa band from WT mice. Experiments were performed in triplicate; α-tubulin was used as a loading control. Data represent means ± SE. **P* < 0.01 vs. WT group.

mice ($\sim 200\%$; $P=0.02$), whereas N-terminal 310-kDa ($\sim 50\%$; $P=0.02$) and 180-kDa ($\sim 74\%$; $P=0.005$) reelin fragments showed a moderate increase (Fig. 1B). Reelin levels in the cerebellum were similar in the *PS1* cKO mice and controls (Fig. 1B).

To assess whether increased reelin levels are due to a higher number of cells expressing reelin in *PS1* cKO mice, we labeled tissue sections with a specific antibody against reelin and counted the number of stained cells (Fig. 2A). The density of reelin-positive cells was similar in the cortices (cingulate and motor cortex) of the control and *PS1* cKO mice (Fig. 2B). Data obtained from immunohistochemistry images did not allow us to quantify the amount of reelin expressed, but the similar number of reelin-expressing cells in the *PS1* cKO and littermate controls indicates that the differences in levels detected by Western blot analysis may be attributable to changes in the level of expression. A quantitative PCR assay was designed to determine whether changes in the reelin protein corresponded to alterations in mRNA expression. Reelin mRNA levels were significantly increased ($\sim 20\%$) in the cortices from the *PS1* cKO mice compared to those from the controls ($P=0.01$; Fig. 2C).

Inhibition of *PS1*/ γ -secretase enhances reelin levels in neuronal cells

The SH-SY5Y neuroblastoma cell line was used to determine whether altered ApoER2 processing influences reelin levels and whether the effect is mediated by γ -secretase. SH-SY5Y cells express significant levels of reelin (29) and *PS1* (34) and have been used as cellular models of ApoER2 overexpression (35). As previously mentioned, the binding of reelin to ApoER2 induces

subsequent ApoER2 cleavage by α - and γ -secretases. The CTF generated after α -secretase cleavage acts as a substrate for γ -secretase, which in turn yields an ICD. (For an illustrative scheme, see Fig. 3A.) Use of a C-terminal ApoER2 antibody identified an ~ 25 -kDa ApoER2-CTF fragment in cell extracts from nontransfected cells, in agreement with previous studies (Fig. 3B and refs. 19, 20, 25). Endogenous ApoER2-ICD was not detected, probably because of its low levels and inherent instability (19). To further characterize the banding pattern for the ApoER2 CTF and the expected ICD fragment, a chimeric ApoER2 protein expressing the transmembrane and cytoplasmic domains tagged to myc (ApoER2 CTF-myc) was overexpressed in SH-SY5Y cells. Another chimeric ApoER2 protein containing only the cytoplasmic domain tagged to HA (ApoER2 ICD-HA) was also expressed (24, 25). Cell extracts were then analyzed by Western blot. An anti-myc antibody detected the ApoER2-CTF-myc at 25 kDa. A faint band of ~ 18 kDa was also detected that may correspond to an ICD-myc fragment resulting from processing of the longer ApoER2-CTF-myc. The specificity of the bands was confirmed by a C-terminal ApoER2 antibody (Fig. 3B). An 18-kDa band was also detected by the anti-HA antibody and the anti-C-terminal ApoER2 antibody in extracts of cells overexpressing ApoER2 ICD-HA, corresponding with the expected size of an ApoER2-ICD fragment (Fig. 3B).

Previous studies show a similar processing mechanism for both APP and ApoER2 (36). Thus, in cells overexpressing *PS1*, γ -secretase activity was monitored by measuring the content in their well-known substrate APP-CTF by Western blot (Fig. 4A). Accordingly, γ -secretase activity increased when the level of the endogenous 25-kDa ApoER2-CTF fragment decreased

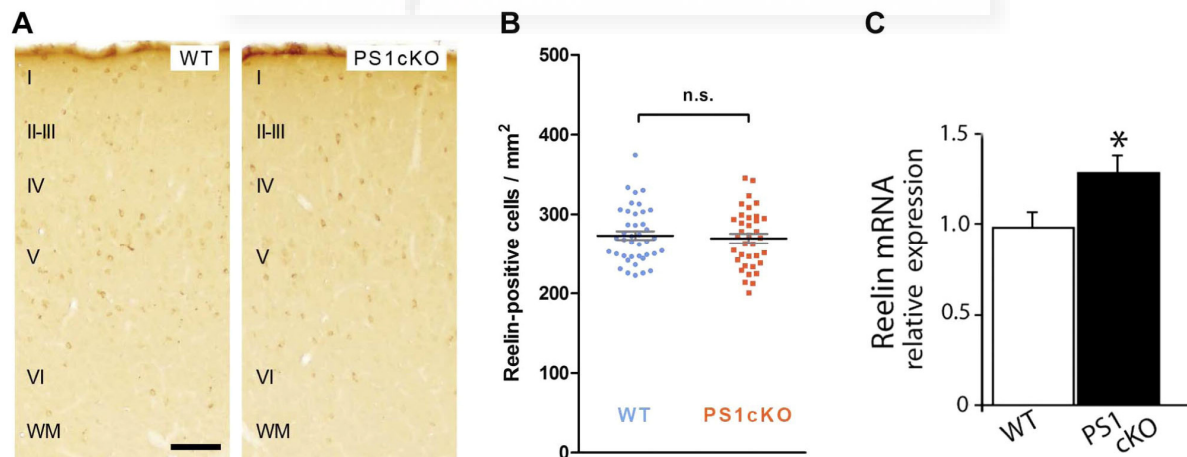


Figure 2. Unaltered number of cells expressing reelin in *PS1* cKO mice and increased levels of reelin mRNA. A) Immunostaining of cortical tissue sections from cingulate and motor cortices of control wild-type (WT) and *PS1* cKO mice with the reelin-specific antibody G10. Scale bar = 100 μ m. B) Scatter plots representing the number of reelin-positive cells quantified by counting the number of stained cells in each section ($n=36$ –40 sections, 4 animals/group), including means \pm SE. C) Relative mRNA levels were analyzed by qRT-PCR in brain cortex (hemisect) from WT and *PS1* cKO mice ($n=8$ each). Values were calculated with relative standard curves and normalized to GAPDH from the same cDNA preparations. Specificity of the PCR products was confirmed by dissociation curve analysis. Results were confirmed in 2 independent determinations. Data represent means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. WT group.

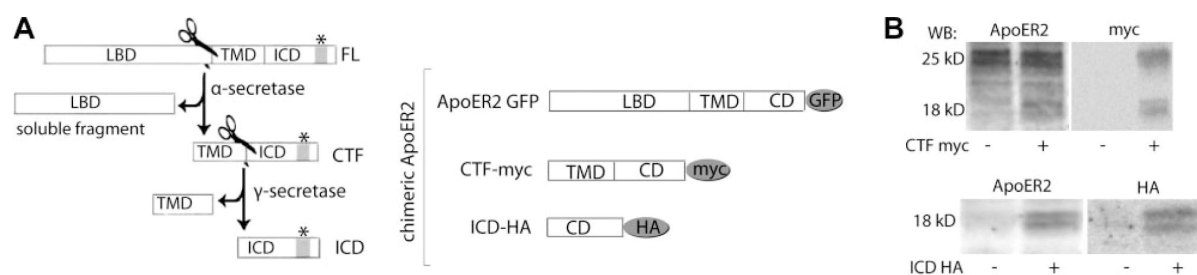


Figure 3. Diagram of ApoER2 and identification of intracellular fragments. *A*) Diagram of the wild-type ApoER2 and chimeric proteins containing the ligand-binding domain (LBD), transmembrane domain (TMD), and cytoplasmic domain (CD). The 2 main processing sites by α - and γ -secretase are indicated. Sequential secretase cleavage generates a membrane-bound CTF and an ICD fragment. Asterisks indicate the approximate location of the epitope for the C-terminal antibody. C-terminal tags for ApoER2 constructs are myc, HA, and EGFP. *B*) Endogenous ApoER2 fragments from nontransfected SH-SY5Y cells (–) were identified by blot analysis with a C-terminal ApoER2 antibody, whereas chimeric proteins expressed in transfected cells (+) were identified by blot analysis with the anti-C-terminal ApoER2 antibody and with antibodies against the specific tag, as indicated.

(~65%; $P=0.03$) in cellular extracts of PS1-overexpressing cells, compared to nontransfected cells (Fig. 4A). The efficiency of the γ -secretase inhibitor DAPT, a well-known γ -secretase inhibitor that targets PS1 (37), was also monitored by measuring the accumulation of APP-CTF in SH-SY5Y cells (Fig. 4B). Under identical conditions, treatment of the cells with DAPT inhibited γ -secretase-mediated processing of the ApoER2-CTF, resulting in increased levels of the 25-kDa fragment (~47% increase, $P=0.01$; Fig. 4B). There was no cell death in cultures treated with 5 μ M DAPT, as evaluated by the MTS assay ($3 \pm 4\%$ reduction, $P=0.7$). Of note, the γ -secretase inhibitor induced an increase in cellular full-length reelin levels (~40% increase, $P=0.003$; Fig. 5); by contrast, the 180-kDa reelin fragment did not change (~20% decrease; $P=0.3$; Fig. 5). Recent evidence indicates that this 180-kDa reelin fragment is generated, at least in part, after interaction of full-length reelin with ApoER2, initiating subsequent endocytosis and proteolysis (38). Our results suggest that reelin processing may depend on ApoER2 binding.

Modulation of ApoER2 expression in SH-SY5Y cells influences cellular reelin expression

To study the effect of ApoER2 overexpression on endogenous reelin levels, SH-SY5Y cells were trans-

fected for 48 h with full-length ApoER2-EGFP. ApoER2-EGFP was detected both intracellularly and at the plasma membrane (identified by staining with N-cadherin, a plasma membrane protein; Fig. 6A). Overexpression of ApoER2 led to a significant decrease in secreted full-length reelin measured in the culture medium (~84%, decrease; $P<0.001$; Fig. 6B). The 180-kDa reelin N-terminal fragment which is generated by extra and intracellular proteolysis (16, 17, 38–40) did not decrease ($P=0.9$; Fig. 6B), suggesting that the decreased levels of full-length reelin is not dependent only on reelin processing. In any event, the influence of ApoER2 in reelin expression is difficult to address by measuring reelin protein levels alone, since increases in the ApoER2 protein would also result in an increased binding to reelin and subsequent processing.

We have shown that treatment of ApoER2-transfected SH-SY5Y cells with the γ -secretase inhibitor DAPT inhibits ApoER2-CTF processing (Fig. 4B). We then investigated the effect of γ -secretase inhibition in the production of ApoER2-ICD in SH-SY5Y cells overexpressing full-length ApoER2-EGFP. ApoER2-EGFP overexpression resulted in immunoreactive bands with a shift in electrophoretic mobility due to the expected size of the EGFP tag (~25–30 kDa; Fig. 7A). Treatment of transfected cells with DAPT induced accumulation

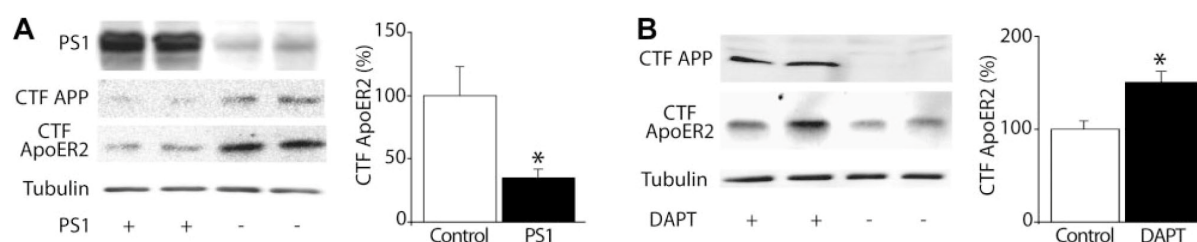


Figure 4. Modulation of γ -secretase activity influences ApoER2 processing. *A*) SH-SY5Y cells were transfected with PS1 (+) or with an empty vector (–). Assessment of APP CTF levels served as a control for greater γ -secretase activity. The accumulation of ApoER2 CTF was monitored with a C-terminal anti-ApoER2 antibody. Data represent percentage relative to control cells (–). Equivalent amounts of protein were loaded in each lane. Tubulin served as the loading control. *B*) SH-SY5Y cells were treated for 24 h in the presence of 5 μ M of DAPT (+) or the vehicle control (–). CTF-APP, as a control of the efficiency of DAPT to inhibit γ -secretase activity, and CTF-ApoER2 were assayed by Western blot of cell extracts. Data represent means \pm SE ($n=8$, from 2 independent experiments). * $P < 0.005$ vs. control group.

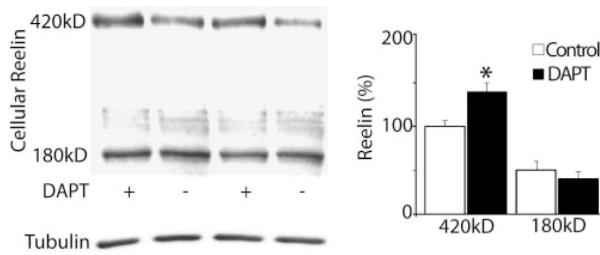


Figure 5. Modulation of γ -secretase activity by DAPT influences reelin levels. Cellular levels of full-length reelin and the 180-kDa N-terminal fragment were assessed after the addition of 5 μ M of DAPT (+) or the vehicle control (-). Immunoreactivity of full-length reelin at 420 kDa and the predominant 180-kDa N-terminal fragment is expressed as a percentage relative to the immunoreactivity of the 420-kDa band from control cells. Data represent means \pm SE ($n=12$; 3 independent experiments). * $P < 0.005$ vs. control group.

of CTF-EGFP (~50 kDa) and parallel decreased generation of the ICD-EGFP (~42-kDa band) (Fig. 7B).

Finally, we studied whether these ApoER2 fragments could translocate to the nucleus to regulate transcriptional activity. SH-SY5Y cells overexpressing ApoER2-EGFP were coimmunostained with emerin, a protein associated with the intranuclear lamina and located at the inner nuclear membrane (41). The analysis of the confocal images revealed the presence of EGFP fluorescence at the internal side of the nuclear membrane and in the nuclear lamina (Fig. 7C). Colocalization of EGFP fluorescence and emerin was decreased after treatment with DAPT, compared to that in the controls ($35 \pm 2\%$ decrease, $P=0.01$; Fig. 7C). Assays of nuclear extraction in cells overexpressing ApoER2-EGFP were also performed. Western blots of the nuclear extracts revealed with anti-GFP and anti-ApoER2 C-terminal antibodies confirmed the presence of an ICD-EGFP in this fraction (Fig. 7D). These results suggest that the ApoER2-ICD translocates to the nucleus.

Quantitative PCR was used to determine whether increased ApoER2 levels, including the ApoER2-ICD, influence reelin mRNA expression. Levels of the reelin transcripts were significantly decreased ($12 \pm 3\%$, $P=0.02$)

in ApoER2-EGFP-overexpressing cells compared to the controls (Fig. 8A). A luciferase reporter gene assay under the control of the *RELN* 5' upstream region (reelin-luc) was designed to further confirm whether ApoER2 modulates reelin transcription. We observed that overexpression of an ICD-HA greatly reduced expression of reelin-luc in transfected cells (~37% decrease in luciferase activity, $P<0.001$; Fig. 8B). Similar results were obtained when the ApoER2 full-length protein was overexpressed (~47% decrease in luciferase activity, $P<0.001$; Fig. 8B). Conversely, in cells treated with DAPT, reelin-luc was increased, compared to the level in the controls (~38% increase, $P=0.02$; Fig. 7B). The specificity of the role of ApoER2 on *RELN* transcriptional activity was corroborated by the lack of effect of DAPT in HEK293 cells ($P=0.9$), a cell line that expresses very low levels of endogenous ApoER2 (14).

To confirm that an ApoER2-ICD binds to the endogenous *RELN* promoter, ChIP assays were performed. Lysates of SH-SY5Y cells transfected with ApoER2-ICD were immunoprecipitated with an anti-HA antibody, and the DNA that bound to HA was amplified by PCR with different primers designed for distinct regions of the *RELN* promoter. As shown in Fig. 8C, ApoER2-ICD binds the *RELN* promoter between the positions -191 to +110 bp, with no binding elsewhere.

Altogether, these results demonstrate that ApoER2 influences reelin at the transcriptional level, and this process may be mediated by the processing of ApoER2 and subsequent generation of an ICD.

DISCUSSION

Reelin binds to ApoER2, a transmembrane protein that belongs to the LDL-receptor family, and this binding induces its cleavage by secretases. In the *PS1* cKO mice, the total level of full-length ApoER2 increased with respect to the littermate controls; and, interestingly, the greater increase was observed for ApoER2-CTF, suggesting a role for PS1 in affecting expression or processing of ApoER2. This CTF is likely to represent the penultimate proteolytic fragment before the final cleav-

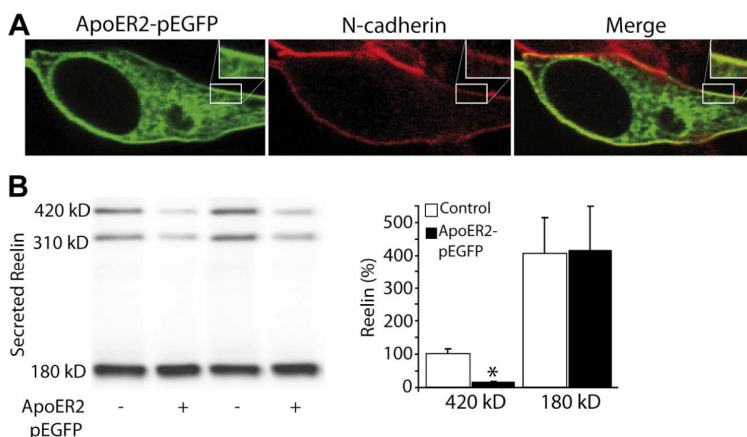


Figure 6. ApoER2 overexpression decreases full-length reelin levels. A) Confocal images of SH-SY5Y cells transfected with full-length ApoER2-EGFP. Cells were incubated with an antibody against GFP to label ApoER2-EGFP and with an antibody against N-cadherin to stain the plasma membrane. Merged image shows ApoER2 localized in the plasma membrane (yellow) as well as intracellularly. Insets show magnification of the selected area. B) ApoER2 overexpression influences reelin secretion, assessed by an antibody against the N terminal. Immunoreactivity of full-length reelin at 420 kDa and the predominant 180-kDa N-terminal fragment is shown and expressed as percentage relative to immunoreactivity of the 420-kDa band from control cells. Data represent means \pm SE of duplicate determinations. * $P < 0.001$ vs. control group transfected with empty vector (-).

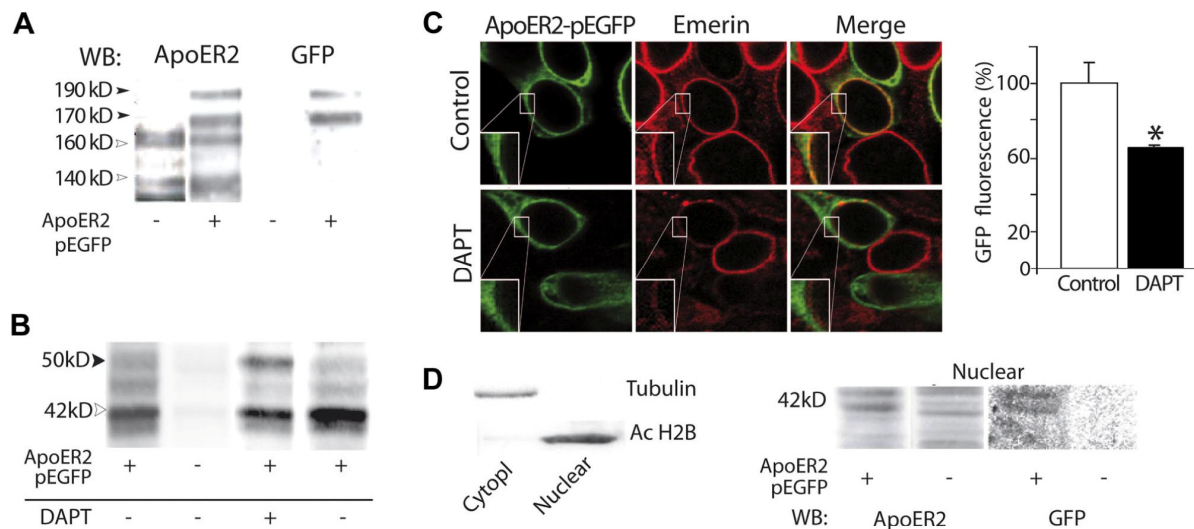


Figure 7. An ApoER2-ICD is identified in the nucleus of full-length ApoER2-EGFP-overexpressing cells. **A)** SH-SY5Y cells were transfected with ApoER2-EGFP. Endogenous and exogenous proteins were identified by blot analysis with anti-C-terminal ApoER2 and anti-GFP antibodies (note the shift due to the EGFP tag). **B)** Generation of CTF-EGFP and ICD-EGFP fragments was monitored in transfected cells treated with the γ -secretase inhibitor DAPT. ApoER2 fragments were detected with an anti-ApoER2 C-terminal antibody. Treatment with DAPT results in an increase of ApoER2-CTF (solid arrowhead) in cell extracts, whereas the ApoER2-ICD band (open arrowhead) is more abundant when γ -secretase activity is not inhibited. **C)** Confocal images of SH-SY5Y cells transfected with full-length ApoER2-EGFP in the presence of DAPT. Cells were incubated for 1 h with or without DAPT (control) before fixation with methanol, followed by incubation with an antibody against GFP to label ApoER2-EGFP fragments and with an antibody against emerlin, a nuclear protein associated with lamina. Insets show magnification of the selected area. Quantification of the ApoER2-EGFP fluorescence that colocalized with emerlin is shown (for control, $n=166$ cells, 2 independent experiments; for DAPT, $n=131$ cells, 2 independent experiments). $*P < 0.001$. **D)** Nuclear fractions from SH-SY5Y cells transfected with full-length ApoER2-pEGFP or a pEGFP vector were analyzed by Western blot with an anti-ApoER2 C-terminal antibody or anti-GFP. ApoER2-ICD was detected in the nuclear fraction of overexpressing cells. Ach2B and tubulin were used as markers for nuclear and cytoplasmic fractions, respectively.

age by γ -secretase, releasing the soluble ICD (19). Unfortunately, we were not able to estimate the levels of ApoER2-ICD in *PS1* cKO mice, probably because of its low levels and inherent instability. Nonetheless, we presumed that lower *PS1* expression, which hampers γ -secretase function, would result in accumulation of CTF and decreased generation of the ApoER2-ICD, as documented for other γ -secretase substrates (22, 42).

More interesting, our data also indicate that the modulation of γ -secretase activity affects not only *PS1* processing of ApoER2, but also reelin levels. In the *PS1* cKO mouse mice, where γ -secretase activity was decreased, the levels of reelin were increased: twice the amount of full-length reelin compared to its N-terminal fragments. Any change in the level of full-length reelin would reflect on reelin processing, which probably occurs in parallel with ApoER2 processing. The *in vivo* control of reelin expression and signaling may be intricate, as the capacity of the functional full-length reelin to bind to its receptors is regulated by competition with the truncated reelin fragments (13). Of note, the deficiency of γ -secretase in the *PS1* cKO mice also led to an increase in reelin mRNA.

The potential modulation of the reelin signaling pathway by γ -secretase has been explored in conventional *PS1* KO mice (43). In that work, no difference in reelin levels was observed between embryonic *PS1*-null mutant and wild-type mice. The cellular pattern of

reelin expression has been demonstrated to differ between the embryonic and the adult brain. At the end of the neuronal migration period in embryos, reelin is predominantly expressed by Cajal-Retzius neurons. These cells are eventually replaced, principally by a subset of GABAergic interneurons in the adult brain (44). Indeed, it is thought that reelin has distinct functions in the developing and adult brain (1). Changes in embryonic and adult expression pattern for the reelin receptor ApoER2 are also expected. Therefore, differences between the embryonic and adult brain in the cellular pattern of expression and in the regulation of reelin and its receptors, may contribute to the divergent results observed in our studies.

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells have enabled us to study whether variation in the levels or processing of ApoER2 could affect reelin expression in a "single" neuron-like cell type. We first confirmed in this cell line that the γ -secretase catalytic subunit *PS1* participated in ApoER2 cleavage. ApoER2-CTF accumulated in cultured SH-SY5Y cells treated with the γ -secretase inhibitor DAPT (both, nontransfected and transfected with full-length ApoER2), but decreased in cells that overexpressed *PS1*. Furthermore, inhibition of γ -secretase with DAPT increased the levels of full-length reelin in cell extracts; although the amounts of the 180-kDa N-terminal fragment of reelin did not appear to be affected. Discrepancies between *in vivo* and *in vitro*

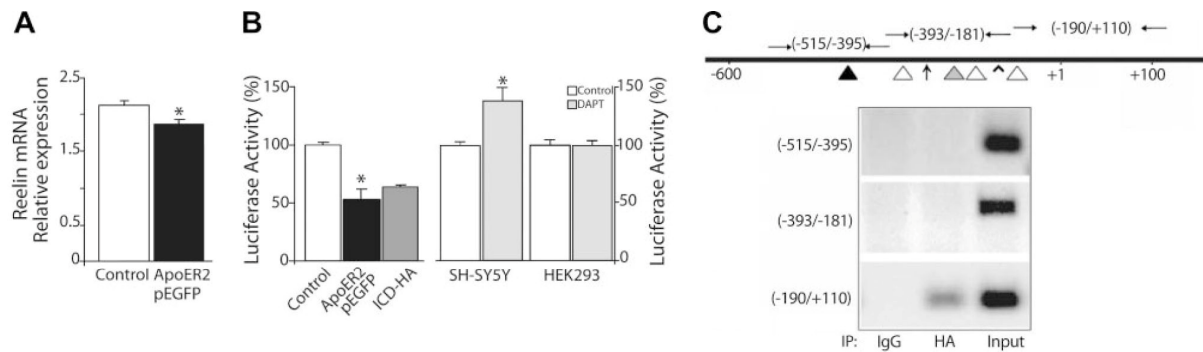


Figure 8. ApoER2 overexpression down-regulates reelin expression. *A*) Reelin transcript levels were analyzed by qRT-PCR in SH-SY5Y cells transfected with full-length ApoER2-pEGFP or a pEGFP vector ($n=10$ each). Values were calculated by using relative standard curves and were normalized to GAPDH from the same cDNA preparations. Results were confirmed in 2 independent determinations. $*P < 0.01$. *B*) SH-SY5Y cells were cotransfected with *RELN* reporter plasmid and ApoER2 (left), either ICD-HA ($n=8$, 2 independent experiments) or full-length ApoER2-EGFP ($n=12$, 3 independent experiments). Empty vectors for each ApoER2 plasmid were used as controls. SH-SY5Y and HEK293 cells transfected with *RELN* reporter plasmid were treated for 24 h in the presence of 5 μ M of DAPT or the vehicle control (right). In all cases, firefly luciferase activity was related to the *Renilla* luciferase reporter. Data ($n \geq 8$ for each condition, obtained from ≥ 2 experiments) were analyzed by 1-way analysis of variance with the Bonferroni *post hoc* test to compare all groups, and exact P values were determined by Student's *t* test. $*P < 0.001$. *C*) Scheme of the proximal region of the *RELN* promoter. Approximate positions of the known transcription factor binding sites are also indicated (CREB: solid triangle; SP1: open triangle; N-Myc: vertical arrow; Mzf1: shaded triangle; Tbr1: caret), together with the position of the primers used for the ChIP analysis (horizontal arrows). SH-SY5Y cells transfected with ApoER2 ICD-HA were also processed for ChIP with an antibody specific for HA or an unrelated rabbit IgG antibody as the control, followed by real-time PCR amplification of various regions of the *RELN* promoter indicated in the schematic. Unprecipitated chromatin preparations were similarly analyzed and used as the input control.

findings regarding the influence of decreasing γ -secretase activity on the generation of reelin fragments may also be related to the complex *in vivo* regulation of reelin expression and signaling. Moreover, we should keep in mind that different cell populations in the brain may respond differently to reelin signaling and to subsequent regulation by a mechanism mediated by reelin and ApoER2 processing.

We also addressed in SH-SY5Y cells whether ApoER2 processing, mediated by PS1/ γ -secretase, can in turn influence reelin expression at the transcriptional level. Transmembrane proteins undergo γ -secretase cleavage, culminating in the release of their ICDs, which translocate to the nucleus and act as transcriptional regulators (45). In contrast, the cleavage of other substrates seems to be merely a degradative function (for a review, see ref. 46). The Notch ICD represents the best γ -secretase substrate studied to date (47), and an ICD transcriptional activity has also been associated with APP (48). The generation of ICD fragments has been shown for other LRP family members (49–51) and its nuclear translocation is inferred. To date, whether the ICD generated from ApoER2 processing has transcriptional activity is unknown.

When cells overexpressed full-length ApoER2, ApoER2-CTF levels were increased in comparison with those in the nontransfected cells, with a parallel increase in the ApoER2-ICD to detectable levels in the cell extract. We observed a parallel reduction in levels of the extracellular reelin protein, indicating that overexpression of full-length ApoER2 promoted an increase in reelin processing. Both overexpression of full-length ApoER2 (and the subsequent increase in the ApoER2-

ICD) and overexpression of the ApoER2-ICD down-regulated *RELN* promoter activity through binding in the *RELN* promoter region. Accordingly, an ApoER2-ICD was found in the soluble nuclear fraction after transfection of SH-SY5Y cells with full length-ApoER2. Of note, when cells overexpressing full length-ApoER2 were incubated with DAPT and the amount of ApoER2-ICD decreased, the ApoER2-EGFP fluorescence at the nucleus also decreased. DAPT treatment, which inhibited the generation of ApoER2-ICD, triggered an increase in *RELN* transcriptional activity. These results suggest that the ApoER2-ICD can act as an inhibitor of reelin synthesis.

To our knowledge, this study is the first to report an autocrine loop that modulates reelin levels where reelin binding activates the processing of its receptor, which in turn regulates the levels of reelin. Previous studies have shown that binding of reelin to its receptors results in processing of the complex, releasing a secreted soluble ApoER2 fragment containing the entire ligand-binding domain. This domain acts in a dominant-negative fashion in the regulation of reelin signaling (14). Our study also demonstrated that ApoER2 modulation of reelin levels could occur within the cells themselves. The secretory nature of reelin and the evidence of a “paracrine” biological activity in distal cells expressing ApoE receptors (52) has attracted much attention in neuropathology. Similar ligands for lipoprotein receptors such as ApoE have also been shown to act as autocrine/paracrine factors (53). Evidence also suggests a role for reelin in autocrine signaling. A dual role for reelin in both autocrine and paracrine signaling has recently been suggested in

neuroblastomas (54). Glutamatergic cerebellar granule neurons, which synthesize reelin, have been shown also to coexpress ApoER2 (55). In addition, reelin and Dab1, the intracellular component of the reelin signaling cascade, are coexpressed in Cajal-Retzius neurons during cortical development and in cortical pyramidal neurons after neuronal migration is complete (56). Reelin and ApoER2 also colocalize in some cells in the adult mouse brain (results not shown), and in ApoER2-enriched areas of the retina (32). *In situ* hybridization studies also demonstrate coexpression of reelin and ApoER2, which are expressed in the same areas in the adult canary brain (57). These data support the idea that, in the adult brain, the action of reelin takes place in proximity to its synthesis. We have observed that transfection of ApoER2 in HEK293 cells, which express very low endogenous levels of reelin and its receptors, triggers a substantial increase in reelin expression (unpublished observation).

A growing number of studies have demonstrated the participation of reelin and elements of its signaling pathway in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Therefore, there is increasing interest in the interaction of members of the reelin cascade with pathways affected in AD. Reelin receptors are also receptors for ApoE, and the ApoE4 variant is the largest known genetic risk factor for late-onset, sporadic AD (58). Secretases also process the transmembrane APP (59), generating the small β -amyloid (A β) peptide, a major AD effector and component of the senile plaques found in AD (60, 61). Reelin and Dab1 have both been shown to interact with APP (62–64) and to influence its trafficking and processing (65, 66). We have demonstrated that A β alters reelin expression (29) and have more recently suggested that reelin signaling is altered in the brain in AD (67). We have showed that reelin expressed in the presence of A β is functionally impaired, since its ability to bind efficiently to ApoER2 is decreased. Impaired reelin binding to its receptors may result in altered generation of ApoER2-ICD and subsequent influence on reelin expression. This effect may be related to the increased reelin expression observed in the AD brain (28, 29). The pathophysiological significance and implications of the altered reelin levels in the diseased brain remain unknown.

In summary, our study suggests that the level of the reelin receptor ApoER2 and its processing influence reelin expression. This effect may be mediated by γ -secretase processing of ApoER2. Our data and other recent findings suggest a scenario where reelin signaling, in conjunction with parallel processing of ApoER2, serves as an autoregulatory mechanism that may ultimately influence synaptic plasticity and responsiveness. **[F]**

The authors thank Drs. W. Rebeck (Georgetown University, Washington, DC, USA), D. Grayson (University of Illinois College of Medicine, Chicago, IL, USA), J. Herz (University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, USA), G. Evin (Department of Pathology, University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia), and A. Barco and J.

Galcerán [Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández–Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sant Joan d'Alacant, Spain] for generously providing cDNAs, antibodies, and technical advice. This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (PS09/00684; PI12/00593); Fundación Ramón Areces; Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III; and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-20925, to C.A.S.). V.B. is supported by a Junta para la Ampliación de Estudios (JAE) predoctoral fellowship from the CSIC, Spain, cofinanced by the Fondo Social Europeo (FSE), European Community. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Beffert, U., Weeber, E. J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J. D., Li, W. P., Adelman, G., Frotscher, M., Hammer, R. E., and Herz, J. (2005) Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* **47**, 567–579
2. Levenson, J. M., Qiu, S., and Weeber, E. J. (2008) The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 422–431
3. Förster, E., Bock, H. H., Herz, J., Chai, X., Frotscher, M., and Zhao, S. (2010) Emerging topics in Reelin function. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 1511–1518
4. D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* **24**, 471–479
5. Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B. W., Goffinet, A., Mumby, M. C., Cooper, J. A., and Herz, J. (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* **24**, 481–489
6. Bar, I., and Goffinet, A. M. (1999) Developmental neurobiology: decoding the Reelin signal. *Nature* **399**, 645–646
7. Cooper, J. A., and Howell, B. W. (1999) Lipoprotein receptors: signaling functions in the brain? *Cell* **97**, 671–674
8. Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A., and Herz, J. (1999) Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* **97**, 689–701
9. Beffert, U., Morfini, G., Bock, H. H., Reyna, H., Brady, S. T., and Herz, J. (2002) Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3 β . *J. Biol. Chem.* **277**, 49958–49964
10. D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719–723
11. Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P., and Cooper, J. A. (1997) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* **389**, 733–737
12. Beffert, U., Durudas, A., Weeber, E. J., Stolt, P. C., Giehl, K. M., Sweatt, J. D., Hammer, R. E., and Herz, J. (2006) Functional dissection of Reelin signaling by site-directed disruption of Disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **26**, 2041–2052
13. Utsunomiya-Tate, N., Kubo, K., Tate, S., Kainosho, M., Katayama, E., Nakajima, K., and Mikoshiba, K. (2000) Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9729–9734
14. Koch, S., Strasser, V., Hauser, C., Fasching, D., Brandes, C., Bajari, T. M., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2002) A secreted soluble form of ApoE receptor 2 acts as a dominant-negative receptor and inhibits Reelin signaling. *EMBO J.* **21**, 5996–6004
15. Kubo, K., Mikoshiba, K., and Nakajima, K. (2002) Secreted Reelin molecules form homodimers. *Neurosci. Res.* **43**, 381–388

16. Jossin, Y., Gui, L., and Goffinet, A. M. (2007) Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons. *J. Neurosci.* **27**, 4243–4252
17. Krstic, D., Rodriguez, M., and Knuesel, I. (2012) Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PLoS ONE* **7**, e47793
18. De Strooper, B., Iwatsubo, T., and Wolfe, M. S. (2012) Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006304
19. May, P., Bock, H. H., Nimpf, J., and Herz, J. (2003) Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **278**, 37386–37392
20. Hoe, H. S., and Rebeck, G. W. (2005) Regulation of ApoE receptor proteolysis by ligand binding. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **137**, 31–39
21. Duit, S., Mayer, H., Blake, S. M., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2010) Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in Reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. *J. Biol. Chem.* **285**, 4896–4908
22. Yu, H., Saura, C. A., Choi, S. Y., Sun, L. D., Yang, X., Handler, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Fedeles, B., Wilson, M. A., Younkin, S., Kandel, E. R., Kirkwood, A., and Shen, J. (2001) APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron* **31**, 713–726
23. Saura, C. A., Choi, S. Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B. S., Chattarji, S., Kelleher, R. J. 3rd, Kandel, E. R., Duff, K., Kirkwood, A., and Shen, J. (2004) Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42**, 23–36
24. Dumanis, S. B., Cha, H. J., Song, J. M., Trotter, J. H., Spitzer, M., Lee, J. Y., Weeber, E. J., Turner, R. S., Pak, D. T., Rebeck, G. W., and Hoe, H. S. (2011) ApoE receptor 2 regulates synapse and dendritic spine formation. *PLoS ONE* **6**, e17203
25. Hoe, H. S., Wessner, D., Beffert, U., Becker, A. G., Matsuoka, Y., and Rebeck, G. W. (2005) F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoER2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9259–9268
26. Culvenor, J. G., Maher, F., Evin, G., Malchiodi-Albedi, F., Cappai, R., Underwood, J. R., Davis, J. B., Karran, E. H., Roberts, G. W., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1997) Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in neuronal cells: evidence for localization to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J. Neurosci. Res.* **49**, 719–731
27. Chen, Y., Sharma, R. P., Costa, R. H., Costa, E., and Grayson, D. R. (2002) On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2930–2939
28. Botella-López, A., Burgaya, F., Gavín, R., García-Ayllón, M. S., Gómez-Tortosa, E., Peña-Casanova, J., Ureña, J. M., Del Río, J. A., Blesa, R., Soriano, E., and Sáez-Valero, J. (2006) Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5573–5578
29. Botella-López, A., Cuchillo-Ibáñez, I., Cotrufo, T., Mok, S. S., Li, Q. X., Barquero, M. S., Dierssen, M., Soriano, E., and Sáez-Valero, J. (2010) Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **37**, 682–691
30. Lugli, G., Krueger, J. M., Davis, J. M., Persico, A. M., Keller, F., and Smalheiser, N. R. (2003) Methodological factors influencing measurement and processing of plasma reelin in humans. *BMC Biochem.* **7**, 4–9
31. De Bergeyck, V., Naerhuyzen, B., Goffinet, A. M., and Lambert de Rouvroit, C. (1998) A panel of monoclonal antibodies against reelin, the extracellular matrix protein defective in reeler mutant mice. *J. Neurosci. Methods* **82**, 17–24
32. Trotter, J. H., Klein, M., Jinwal, U. K., Abisambra, J. F., Dickey, C. A., Tharkur, J., Masiulis, L., Ding, J., Locke, K. G., Rickman, C. B., Birch, D. G., Weeber, E. J., and Herz, J. (2011) ApoER2 function in the establishment and maintenance of retinal synaptic connectivity. *J. Neurosci.* **31**, 14413–14423
33. Mayer, H., Duit, S., Hauser, C., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2006) Reconstitution of the Reelin signaling pathway in fibroblasts demonstrates that Dab1 phosphorylation is independent of receptor localization in lipid rafts. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 19–27
34. Silveyra, M. X., García-Ayllón, M. S., Serra-Basante, C., Mazzoni, V., García-Gutiérrez, M. S., Manzanares, J., Culvenor, J. G., and Sáez-Valero, J. (2012) Changes in acetylcholinesterase expression are associated with altered presenilin-1 levels. *Neurobiol. Aging* **33**, 627.e27–e37
35. Hoe, H. S., Cooper, M. J., Burns, M. P., Lewis, P. A., van der Brug, M., Chakraborty, G., Cartagena, C. M., Pak, D. T., Cookson, M. R., and Rebeck, G. W. (2007) The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *J. Neurosci.* **27**, 10895–10905
36. Wagner, T., and Pietrzik, C. U. (2012) The role of lipoprotein receptors on the physiological function of APP. *Exp. Brain Res.* **217**, 377–387
37. Lanz, T. A., Himes, C. S., Pallante, G., Adams, L., Yamazaki, S., Amore, B., and Merchant, K. M. (2003) The gamma-secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces A beta levels in vivo in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 864–871
38. Hibi, T., and Hattori, M. (2009) The N-terminal fragment of Reelin is generated after endocytosis and released through the pathway regulated by Rab11. *FEBS Lett.* **583**, 1299–1303
39. Lambert de Rouvroit, C., de Bergeyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y., and Goffinet, A. M. (1999) Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp. Neurol.* **156**, 214–217
40. Hisanaga, A., Morishita, S., Suzuki, K., Sasaki, K., Koie, M., Kohno, T., and Hattori, M. (2012) A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett.* **586**, 3349–3353
41. Squarzoni, S., Sabatelli, P., Ognibene, A., Toniolo, D., Cartegni, L., Cobianchi, F., Petrini, S., Merlini, L., and Maraldi, N. M. (1998) Immunocytochemical detection of emerin within the nuclear matrix. *Neuromuscul. Disord.* **8**, 338–344
42. Saura, C. A., Servián-Morilla, E., and Scholl, F. G. (2011) Presenilin/ γ -secretase regulates neurexin processing at synapses. *PLoS ONE* **6**, e19430
43. De Gasperi, R., Gama Sosa, M. A., Wen, P. H., Li, J., Perez, G. M., Curran, T., and Elder, G. A. (2008) Cortical development in the presenilin-1 null mutant mouse fails after splitting of the preplate and is not due to a failure of reelin-dependent signaling. *Dev. Dyn.* **237**, 2405–2414
44. Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M. G., Uzunov, D. P., Costa, E., Guidotti, A., and Caruncho, H. J. (1998) Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3221–3226
45. Rochette, M. J., and Murphy, M. P. (2002) Gamma-secretase: substrates and inhibitors. *Mol. Neurobiol.* **26**, 81–95
46. Lleó, A., and Saura, C. A. (2011) γ -Secretase substrates and their implications for drug development in Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 1513–1527
47. Lai, E. C. (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965–973
48. Müller, T., Meyer, H. E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—relevance for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **85**, 393–406
49. May, P., Reddy, Y. K., and Herz, J. (2002) Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 18736–18743
50. Wicher, G., Larsson, M., Fex Svenningsen, A., Gyllencreutz, E., Rask, L., and Aldskogius, H. (2006) Low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin is expressed in oligodendrocytes in the mouse spinal cord white matter. *J. Neurosci. Res.* **83**, 864–873
51. Polavarapu, R., An, J., Zhang, C., and Yepes, M. (2008) Regulated intramembrane proteolysis of the low-density lipoprotein receptor-related protein mediates ischemic cell death. *Am. J. Pathol.* **172**, 1355–1362
52. Smalheiser, N. R., Costa, E., Guidotti, A., Impagnatiello, F., Auta, J., Lacor, P., Kriho, V., and Pappas, G. D. (2000) Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars

- intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1281–1286
53. Gan, H. T., Tham, M., Hariharan, S., Ramasamy, S., Yu, Y. H., and Ahmed, S. (2011) Identification of ApoE as an autocrine/paracrine factor that stimulates neural stem cell survival via MAPK/ERK signaling pathway. *J. Neurochem.* **117**, 565–578
 54. Becker, J., Fröhlich, J., Perske, C., Pavlakovic, H., and Wiltig, J. (2012) Reelin signalling in neuroblastoma: migratory switch in metastatic stages. *Int. J. Oncol.* **41**, 681–689
 55. Sinagra, M., Gonzalez Campo, C., Verrier, D., Moustié, O., Manzoni, O. J., and Chavis, P. (2008) Glutamatergic cerebellar granule neurons synthesize and secrete reelin in vitro. *Neuron Glia Biol.* **4**, 189–196
 56. Deguchi, K., Inoue, K., Avila, W. E., Lopez-Terrada, D., Antalffy, B. A., Quattrocchi, C. C., Sheldon, M., Mikoshiba, K., D'Arcangelo, G., and Armstrong, D. L. (2003) Reelin and disabled-1 expression in developing and mature human cortical neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 676–684
 57. Balthazart, J., Voigt, C., Boseret, G., and Ball, G. F. (2008) Expression of reelin, its receptors and its intracellular signaling protein, Disabled1 in the canary brain: relationships with the song control system. *Neuroscience* **153**, 944–962
 58. Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Pericak-Vance, M. A., Goldgaber, D., and Roses, A. D. (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9649–9653
 59. Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. W., and Xu, H. (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **120**(Suppl. 1), 9–21
 60. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4245–4249
 61. Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733–736
 62. Hoe, H. S., Lee, K. J., Carney, R. S., Lee, J., Markova, A., Lee, J. Y., Howell, B. W., Hyman, B. T., Pak, D. T., Bu, G., and Rebeck, G. W. (2009) Interaction of Reelin with APP promotes neurite outgrowth. *J. Neurosci.* **29**, 7459–7473
 63. Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B., and Herz, J. (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 33556–33560
 64. Howell, B. W., Lanier, L. M., Frank, R., Gertler, F. B., and Cooper, J. A. (1999) The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5179–5188
 65. Parisiadou, L., and Efthimiopoulos, S. (2007) Expression of mDab1 promotes the stability and processing of amyloid precursor protein and this effect is counteracted by X11alpha. *Neurobiol. Aging* **28**, 377–388
 66. Hoe, H. S., Tran, T. S., Matsuoka, Y., Howell, B. W., and Rebeck, G. W. (2006) Dab1 and Reelin effects on APP and ApoE2 trafficking and processing. *J. Biol. Chem.* **281**, 35176–35185
 67. Cuchillo-Ibáñez, I., Balmaceda, V., Botella-López, A., Rabano, A., Avila, J., and Sáez-Valero, J. (2013) Beta-amyloid impairs reelin signaling. *PLoS ONE* **8**, e72297

Received for publication July 25, 2013.
Accepted for publication December 2, 2013.



ANEXO. *“Los niveles del fragmento soluble del receptor de reelina ApoER2 están disminuidos en LCR de pacientes con Alzheimer”*

A soluble ApoER2 fragment is decreased in Alzheimer disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF).

We have attempted to investigate evidences for an impaired Reelin signaling in the AD brain by characterizing ApoER2 processing associated to ligand binding. Transduction of Reelin signaling in neurons begins after Reelin binds to ApoER2, this binding inducing the clustering (Strasser et al., 2004) and the proteolytic processing of the receptor (Rebeck et al., 2006). ApoER2 appears to be the dominant Reelin receptor in the forebrain, participating of the modulation of synaptic plasticity and memory formation (Beffert et al., 2005). The cleavage of ApoER2 induced by Reelin binding is carried out by the sequential action of α - and γ -secretases (Duit et al., 2010; May et al., 2003; Rebeck et al., 2006).

Here we demonstrate that cleavage of ApoER2 indeed takes place in presence of Reelin, generating a soluble polypeptide receptor fragment. Using an anti-ApoER2 antibody 186, raised to the entire ligand binding domain (Strasser et al., 2004), we characterized an immunoreactive fragment of ~66 kDa in the culture medium of SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with recombinant Reelin. The existence of a secreted soluble ApoER2 fragment, consisting of the entire ligand-binding domain that can act in a dominant-negative fashion in the regulation of Reelin signaling has been previously demonstrated (Koch et al., 2002). This soluble 66 kDa ApoER2 fragment was assessed in CSF from AD and non-disease control (ND) subjects. Two immunoreactive bands of 66 and 55 kDa were observed in all CSF samples analysed (Fig.1 panel A). In all cases, the 66 kDa ApoER2 fragment was the most abundant. A significant (~56%) decrease in this 66 kDa ApoER2 fragment was observed in AD cases, compared to ND subjects ($p= 0.02$; Fig. panel B). Interestingly, no changes were observed in the total amount of Reelin (Fig. panel C), while an alteration in Reelin glycosylation in the CSF of AD patients

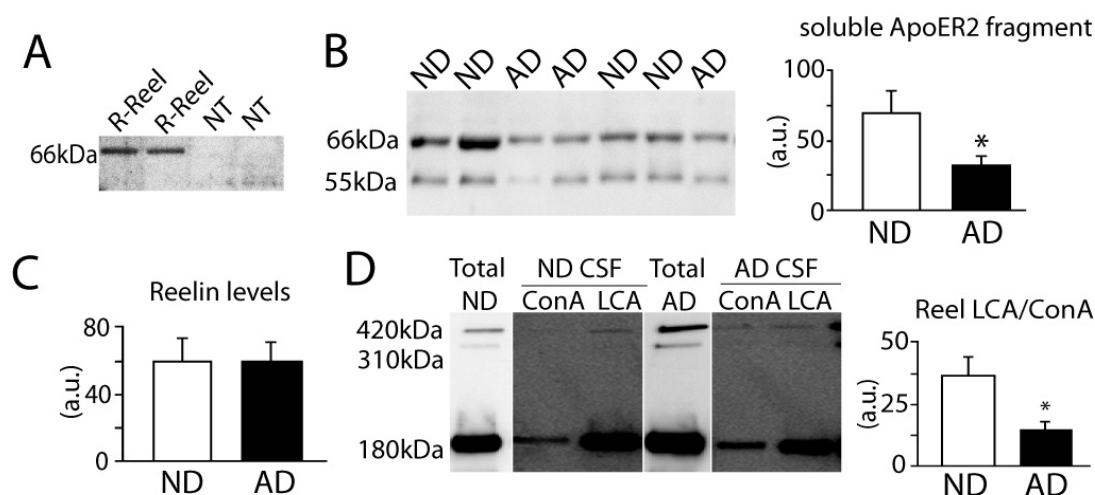


Figure 1. An ApoER2 soluble fragment present in CSF is decreased in Alzheimer subjects.

(A) The appearance of a soluble ApoER2 fragment, containing the ligand binding domain, in the culture medium of cells was monitored with the anti-ApoER2 antibody 186 in SH-SY5Y cells treated with recombinant Reelin (R-Reel) from transfected HEK-293 cells (NT, non treated). (B) Representative blot and densitometric quantification of the 66 kDa soluble fragment of ApoER2, assayed with the antibody 186 in CSF samples from non-dement (ND) and Alzheimer disease (AD) subjects. (C) Total immunoreactivity from the CSF samples of the full-length 420 kDa Reelin and the 310 and 180 kDa Reelin fragments. (D) Reelin glycosylation pattern was evaluated by lectin binding assay with immobilized lectins Con A and LCA. The levels of unbound Reelin were determined by Western blotting. Reelin LCA/Con A ratio was estimated for the major Reelin fragment as the % 180 kDa Reelin unbound to LCA / % 180 kDa Reelin unbound to Con A (in all samples the full-length 420 kDa Reelin and the two N-terminal 310 and 180 kDa fragments exhibit a similar tendency of binding to the lectins). Values are means \pm SEM; t-test, * $p < 0.05$.

was demonstrated by a lectin-binding assay based in mannose specific lectins (Fig. 1 panel D). Reelin glycoforms from ND CSF patients bind strongly to Con A and more weakly to LCA; whereas in AD, the affinity of Reelin glycoforms for LCA is similar or higher than for Con A. In previous studies (Botella-López et al., 2006; 2010), differences in the binding affinities of the Reelin glycoforms, expressed as a ratio of the Reelin that does not bind LCA respect to the Reelin that does not bind to Con A, has provided a discrimination factor between the AD and ND groups (Fig.1 panel D). We can speculate that the decreased levels of the soluble ApoER2 fragments in the CSF in AD reflects a lower post-Reelin-binding processing of ApoER2, and favors the hypothesis that Reelin signaling pathway is impaired in the AD brain.

Material and Methods

Cell cultures

SH-SY5Y cells were seeded in 75 cm² flasks at a density of 8×10^4 cells/flask and cultured in DMEM supplemented with Glutamax (Invitrogen), 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. To differentiate the cells, serum was reduced to 3% and 3 doses in 5 days of 10 µM all-trans-retinoic acid (Sigma) were added. Serum was further reduced to 0.5% and 50 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (Sigma) was added for 1 day. Recombinant Reelin protein was collected from the media of transfected HEK-293T cells expressing human Reelin (gift from T. Curran). The supernatant was centrifuged for 5 min at 1,000×g and stored at -80°C.

Collection of human CSF and human brain samples

This study was approved by the local ethics committees of all the centres involved and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. *Antemorten* CSF samples were collected from patients at the “Hospital Clínico San Carlos” (Madrid, Spain), diagnosed for probable Alzheimer’s type dementia following the DSM-VI criteria (American Psychiatric Association, 1994) and the criteria established by the Working Group of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) and the Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (ADRD) (McKhann et al., 1984). 10 probable AD cases (77 ± 2 years) and 8 non demented (ND) controls (72 ± 3 years) were analysed. CSF aliquots were stored at -80°C until use.

Western Blotting and antibodies

CSF samples (50 µl) were boiled for 3 min, and then resolved for Reelin on 6% polyacrylamide gels. Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes and incubated with the anti-Reelin 142 antibody (Merck Millipore). ApoER2 soluble fragment (antibody 186, from J. Nimpf) was detected by Western blot following resolution on 10% polyacrylamide gels. The signal was visualized by ECL (GE Healthcare Life Science) and analyzed using Science Lab Image Gauge v3.0 software (Fujifilm).

Lectin binding analysis of Reelin

Aliquots (100 µl) of CSF were mixed with 40 µl of immobilized lectins that recognize mannosyl residues, but with subtle differences in their structure (*Canavalia ensiformis*, Con A, and *Lens culinaris agglutinin*, LCA, from Sigma-Aldrich), thus allowing to study fine differences in complex carbohydrate structures, and incubated overnight at 4°C. Unbound Reelin was separated by centrifugation and examined by Western blotting.

References

- Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, et al. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 2005; 47: 567-579.
- Botella-López A, Burgaya F, Gavín R, García-Ayllón MS, Gómez-Tortosa E, Peña-Casanova J, et al. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5573-5578.
- Botella-López A, Cuchillo-Ibáñez I, Cotrufo T, Mok SS, Li QX, Barquero MS, et al. Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 682-691.
- Duit S, Mayer H, Blake SM, Schneider WJ, Nimpf J. Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in Reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. *J Biol Chem* 2010; 285: 4896-4908.
- May P, Bock HH, Nimpf J, Herz J. Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by gamma-secretase. *J Biol Chem* 2003; 278: 37386-37392.
- Rebeck GW, LaDu MJ, Estus S, Bu G, Weeber EJ. The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. *Mol. Neurodegener* 2006; 24: 1-15.
- Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock HH, Hiesberger T, et al. Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1378-1386.

6. DISCUSIÓN

Los resultados que se han presentado en esta tesis nos han permitido avanzar en el estudio de la alteración en la señalización de la reelina en el cerebro de personas con Alzheimer, donde hemos evaluado las consecuencias fisiopatológicas de la alteración en la expresión y procesamiento de reelina en el cerebro de sujetos afectados por de la demencia.

Esta Tesis agrupa dos estudios, 1) el efecto del péptido A β sobre la glicosilación y dimerización de reelina, que conduce a una alteración en su cascada de señalización (*Cuchillo-Ibáñez y col, 2013*) y 2) los mecanismos que modulan la expresión génica de la reelina, los cuales derivan del procesamiento del receptor de la reelina, el ApoER2 (*Balmaceda y col, 2013*). Además, hemos incluido un *Anexo* conteniendo datos adicionales, todavía sin publicar, sobre la determinación de fragmentos derivados del procesamiento del receptor ApoER2. Hacemos referencia a estos datos con el fin de dar una visión más global de nuestros hallazgos.

Las bases de este estudio provienen de trabajos previos de nuestro laboratorio, en donde se observó que la reelina extraída de cerebros de personas con la EA presenta una expresión alterada, mostrando aumentos en sus niveles de proteína y transcrito, y manifestando además una glicosilación anómala (*Sáez-Valero y col, 2003; Botella-López y col, 2006; 2010*). Algo semejante se observó en cerebros de sujetos con síndrome de Down (*Botella-López y col, 2010*), en donde la sobreexpresión del gen de APP, localizado en el cromosoma 21, afectado por la trisomía, incrementa los niveles de A β . Esto señalaba al A β como un posible inductor de los cambios observados en la reelina en la EA, lo que fue corroborado en líneas celulares neuronales tratadas con el péptido A β . Se observó que el tratamiento con el péptido incrementaba los niveles de la reelina y además inducía un cambio en su patrón de interacción con lectinas, de manera semejante a lo observado en la reelina extraída de cerebros de pacientes con EA (*Botella-López y col, 2010*). La glicosilación es posiblemente la

modificación postraducciona más común, y también la más compleja. Este proceso interviene en el plegamiento, el tráfico celular, la ubicación final y la funcionalidad de las glicoproteínas. Además de nuestros estudios, otros grupos también han reportado alteraciones en el patrón de glicosilación de diversas proteínas presentes en cerebro de enfermos de EA (*Sáez-Valero y col, 1997; Guevara y col, 1998; Sáez-Valero y Small, 2001; Fodero y col, 2002; Kanninen y col, 2004; Sihlbom y col, 2008; Schedin-Weiss y col, 2014*). Sin embargo, hasta la fecha no existen datos concluyentes sobre si en la patología de EA los mecanismos postraduccionales de glicosilación están afectados.

Dado que cada tipo celular tiene un mecanismo de glicosilación propia, tampoco podemos obviar que si la proporción de distintos subtipos de neuronas que expresan la reelina cambia en el cerebro patológico, sería posible que esto condujera a cambios en el patrón de glicosilación de las proteínas observadas en LCR o extractos cerebrales. Sin embargo, la glicosilación de la reelina se encontró modificada en el monocultivo de la línea celular SH-SY5Y tratada con A β (*Botella-López y col, 2010*). Estas observaciones son indicativas de que el péptido β -amiloide promueve alteraciones en la glicosilación celular de la reelina; queda por determinar el mecanismo por el que ejerce este efecto.

Una importante cuestión que se originó tras estos estudios. y en la que centramos nuestro interés, fue si los cambios en glicosilación de la reelina comprometían su funcionalidad biológica.

En el trabajo de *Cuchillo-Ibáñez y col, 2013*, hemos comprobado que la reelina anormalmente glicosilada obtenida de los sobrenadantes de cultivos celulares tratados con A β , pierde su capacidad de formar estructuras diméricas, comprometiendo su actividad biológica, ya que es la reelina dimérica la que interacciona con el receptor y desencadena la señal intracelular, como se ha discutido en el *Capítulo 4*. En este trabajo, también hemos demostrado que la reelina extraída del cerebro de personas con la EA forma abundantes oligómeros de elevado peso molecular en lugar de dímeros. Nuevamente es necesario señalar que el proceso de glicosilación

determina en gran medida el plegamiento de las glicoproteínas, permitiéndoles adoptar su estructura ternaria y/o cuaternaria óptima para su actividad biológica. En este contexto, se ha observado que las modificaciones de la glicosilación observadas sobre ciertas proteínas favorecen una agregación de tipo amiloide (*Iannuzzi y col, 2013*) y, también, que la pérdida de plegamiento de diversas proteínas puede inducir su propia agregación (*Invernizzi y col, 2012; Ferreira y col, 2006*). De hecho, la reelina forma agregados cerebrales, un fenómeno que se asocia al envejecimiento (*Knuesel y col, 2009; Madhusudan y col, 2009*); pero que se ha postulado podrían también contribuir al progreso de la amiloidosis característica de la EA (*Doehner y col, 2010; Krstic y col, 2013*). Así, se ha descrito tanto en cerebro de roedores, como de primates adultos y humanos, que los agregados de reelina colocalizan con depósitos oligoméricos de A β (*Knuesel y col, 2009, Notter y Knuesel, 2013*). Por lo tanto, planteamos que la presencia de una reelina con una glicosilación anómala y con mayor tendencia a formar oligómeros, podría inducir la formación de agregados en tejido cerebral, quizás también conteniendo oligómeros de A β , que favorecería la formación de placas amiloides. Por tanto, creemos que resultaría interesante analizar qué tipo de reelina se encuentra en las placas seniles de cerebros de EA.

Nuestro grupo también ha investigado la interacción proteína-proteína entre la reelina soluble y el A β , ya que co-inmunoprecipitan en extractos de corteza humana (datos no incluidos en esta memoria y que forman parte de un artículo en preparación). La agregación amiloidogénica altera propiedades fisicoquímicas de las proteínas con las que interactúa y esto afecta a sus actividades biológicas (*Olzscha y col, 2011*). De este modo, la presencia de A β podría modificar la función de la reelina ya sea por una interacción directa con ella o bien modificando la vía de su glicosilación. Por lo que no podemos descartar que la interacción directa de la reelina con A β comprometa la funcionalidad de ésta glicoproteína. Estos efectos, no excluyentes uno del otro, contribuirían a la falta de actividad biológica de la reelina en el cerebro de individuos con la EA.

A nivel funcional, resultó interesante observar que *in vitro* la reelina expresada en presencia de A β muestra una menor afinidad de unión por su receptor ApoER2 (*Cuchillo-Ibáñez y col, 2013*). Queda por demostrar si la reelina presente en cerebros con la EA presenta de manera semejante una afinidad disminuida por ApoER2. Estos ensayos están en actual realización por nuestro grupo.

Una forma alternativa de examinar el grado de interacción entre la reelina y su receptor es analizar los productos de proteólisis de su receptor. Como hemos comentado en el *Capítulo 4*, en condiciones biológicas normales, después de que la interacción con la reelina se haya concretado, ocurre la proteólisis del ApoER2 por la acción secuencial de la α - y la γ -secretasa (*Hoe y Rebeck, 2005; May y col, 2002*). Nosotros hemos sido capaces de detectar fragmentos solubles de ApoER2 en LCR humano (*Anexo*), los cuales se generarían tras el corte de la α -secretasa (*Koch y col, 2002*). Los niveles de este fragmento soluble aparecen disminuidos en el LCR de pacientes con la EA, en comparación con pacientes controles. Este hecho es concordante con nuestra hipótesis, ya que la reelina en el cerebro de personas con la EA no sería capaz de unirse eficientemente a ApoER2, y este hecho afectaría al procesamiento del receptor, provocando una disminución de los niveles de este fragmento soluble. Y lo que es más importante, estos datos corroboran que la vía de señalización de reelina no funciona de manera adecuada en el cerebro de sujetos con Alzheimer.

Una disminución de la afinidad de la reelina por su receptor afectaría a la cascada de señalización intracelular activada por la reelina, y como consecuencia, alteraría los procesos celulares que son regulados por esta glicoproteína. En este contexto, el tratamiento de cultivos primarios neuronales con la reelina obtenida en presencia de A β fue esclarecedor (*Cuchillo-Ibáñez y col, 2013*). La reelina obtenida en presencia de A β no interacciona apropiadamente con su receptor y falla en activar a la proteína adaptadora Dab1 lo que determina que la quinasa GSK-3 β permanezca en un estado activo y favorece la fosforilación de la proteína tau. Estas observaciones nos permiten plantear que aunque los niveles de reelina sean altos en cerebros con la EA su funcionalidad está comprometida y resulta

ineficaz en modular los procesos celulares en los que participa, viéndose favorecida la formación ovillos neurofibrilares (*Beffert y col, 2002; Kocherhans y col, 2010*), que como vimos en el *Capítulo 1*, es un proceso implicado en el desarrollo de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (*Ávila, 2000*).

Debido a que el péptido A β es el factor que promueve la presencia de glicoformas de reelina con una función biológica alterada, y a su vez, estas formas anormales inducen los niveles anormalmente altos de la proteína tau fosforilada; la reelina aparece como una proteína que relaciona directamente ambos efectores tóxicos del Alzheimer: el péptido A β y la proteína tau en un estado hiperfosforilado.

Nuestros datos indican que los niveles de reelina están incrementados en extractos cerebrales de sujetos con la EA, pero ello no significa una mayor activación de su cascada. Así, la mayor parte de la reelina presente en el cerebro patológico no muestra una funcionalidad adecuada, medida como efectividad en la unión a su receptor y la formación de dímeros, y en efecto los niveles de la reelina biológicamente activa serían bajos. Además, es probable que la oligomerización de glicoformas de reelina alteradas “secuestre” parte de la reelina activa, bloqueando su función.

No obstante, sin entrar en la caracterización de la glicosilación de reelina, sigue siendo controvertido cuáles son realmente los niveles totales de la reelina en el cerebro de personas con la EA e incluso en modelos murinos de sobreexpresión amiloide. Mientras nuestros datos y de otros grupos apuntan al aumento de reelina en el cerebro de pacientes con la EA (*Sáez-Valero y col, 2003; Botella-López y col, 2006; 2010 Kramer y col, 2011; Santa María y col, 2010*), otros grupos de investigación reportan una depleción (*Chin y col, 2007; Hoe y col, 2009; Herring y col, 2012*). No existe una razón clara para explicar estas divergencias; pero creemos que diversos aspectos metodológicos, sumados a las condiciones de extracción de la reelina particularmente en cerebro de sujetos con Alzheimer, contribuyen a estas divergencias. De este modo, es posible que una importante fracción de la reelina no se extraiga adecuadamente debido a su interacción con los

depósitos amiloides, lo que la hace difícilmente extraíble. Además, es importante destacar la baja estabilidad de la reelina, ya que se degrada fácilmente con las variaciones de temperatura, como ocurre con los cambios de temperatura durante el análisis por electroforesis y Western blot, así como con ciclos de congelación y descongelación, o un almacenamiento prolongado a -20°C (*Botella-López y col, 2006*). También hemos observado una alta variabilidad tanto a nivel de la proteína como de su transcripto en tejido de sujetos con Alzheimer. Todo ello nos lleva a considerar que sólo el análisis de colecciones largas de muestras, junto a un adecuado manejo experimental de las mismas, ayudará a resolver si la reelina está aumentada o disminuida en el cerebro de personas con la EA.

La reelina mantiene una influencia recíproca con la producción del péptido A β . Esta relación surge de estudios en los que se ha detectado que la interacción entre la reelina y el APP, mediante Dab1 (*Hoareau y col, 2008*), regula el tráfico y el procesamiento del APP (*Minami y col, 2011*). En este sentido, no sería imprudente presumir que una reelina incapaz de activar su vía de señalización, podría determinar también alteraciones en el balance del procesamiento amiloidogénico/no amiloidogénico del APP. Resultaría interesante comprobar si la presencia de glicoformas de la reelina anormalmente glicosilada podría aumentar la producción de péptidos A β . Esto contribuiría a la alteración de la glicosilación y dimerización de reelina por el exceso de A β , generando un bucle pernicioso que conduciría finalmente a la depleción de la actividad sináptica y a la muerte neuronal observada en la EA.

Asociado a la interacción que ocurre entre la reelina y su receptor, no podemos dejar de ahondar en el subsecuente procesamiento del ApoER2. Tras la interacción con reelina, ApoER2 sufre un primer corte por enzimas con actividad α -secretasa, que conlleva la liberación de un fragmento soluble del receptor; el procesamiento continúa en su región de transmembrana mediante la γ -secretasa. Este corte libera un fragmento intracelular (ICD) del ApoER2, de manera semejante a lo observado con diversas proteínas de transmembrana como el APP y Notch (comentado en los *Capítulos 2 y 5*).

En *Balmaceda y col, 2013*, decidimos analizar el procesamiento del ApoER2 por γ -secretasa y la posible actividad transcripcional de su ICD. Nuestro estudio demuestra que el ApoER2-ICD se localiza en el núcleo celular, co-inmunoprecipita con la región promotora del gen de la reelina y regula negativamente su expresión. El bloqueo del procesamiento del receptor *in vitro* con un inhibidor de γ -secretasa, induce un aumento de la expresión de la reelina, de igual manera a lo que se observa *in vivo* en la corteza de ratones *knock-out* de PS1.

Estos resultados demuestran una auto-regulación de los niveles de reelina que dependen de su interacción con el receptor, y por lo tanto de su acción biológica. Estos datos resultan ser compatibles con nuestra hipótesis que plantea que en el cerebro de sujetos con la EA, la reelina interactúa de manera ineficiente con su receptor (*Cuchillo Ibáñez y col, 2013*). Por lo que una unión ineficiente entre la reelina y el ApoER2 determinaría también una menor generación no sólo del fragmento soluble extracelular detectado en el LCR (*Anexo*), sino también de su ICD. Como consecuencia, una escasa generación del ApoER2-ICD favorecería aumentos en la expresión de la reelina, como detectamos en el cerebro de sujetos con la EA. El por qué y el cómo se genera una reelina anormalmente glicosilada en una condición amiloide es lo que queda por averiguar, aunque nuestros resultados sugieren que estas alteraciones son promovidas directamente por el A β . En relación con la EA, el papel que tendría la PS1 en el procesamiento de ApoER2 y la sucesiva regulación de la reelina, necesitan estudiarse con más profundidad. Hay que recordar, como discutimos en el *Capítulo 2*, que las mutaciones detectadas sobre la PS1 que dan origen a las variantes familiares de la EA, favorecen la producción de A β 42 altamente tóxico (*St George-Hyslop, 2000*).

Resulta complicado determinar los niveles del fragmento ICD del ApoER2 en tejido cerebral tanto de humano como de ratón. Esto probablemente sea debido a sus bajos niveles y su inestabilidad. Algo semejante a lo que ocurre con el ICD del APP, de los que no existen datos claros acerca de si su generación está aumentada en la EA. De hecho, nuestro grupo tampoco ha

sido capaz de determinar la presencia del ApoER2-ICD en extractos de cerebro humano, aunque presumimos que están disminuidos en el cerebro de sujetos con Alzheimer. En cuanto a la similitud existente entre el APP y el ApoER2, hay que recordar que el APP es objeto de procesamiento alternativo por combinación α/γ -secretasa, en la vía de procesamiento no amiloidogénico, o bien por la combinación β/γ -secretasa, en la vía amiloidogénica; mientras que para el ApoER2 sólo conocemos el procesamiento α/γ -secretasa. Otra diferencia entre ambas proteínas es que mientras el procesamiento de ApoER2 es activado por unión de su ligando reelina, se desconoce cómo se activa el procesamiento del APP (*Thinakaran y Koo, 2008; Haass y col, 2012*). Además de que la baja afinidad de la reelina por el ApoER2 en el cerebro de sujetos con EA determinaría un menor procesamiento del receptor, resulta difícil intuir como un malfuncionamiento de la actividad γ -secretasa, en el contexto del Alzheimer, pueda repercutir en el procesamiento del ApoER2 y si promovería mayor o menor procesamiento del mismo.

Además de la regulación de la reelina modulada por el procesamiento de su receptor, existen otros mecanismos moleculares implicados en su regulación. En varios desordenes psiquiátricos como la esquizofrenia, el desorden bipolar y el autismo, se ha observado un fallo en la regulación epigénica de la reelina. Este tipo de regulación implica modificaciones sobre la molécula de ADN o bien sobre sus proteínas asociadas (*Levenson y Sweatt, 2005*). En estas patologías, se ha observado una disminución de la actividad del promotor de la reelina, provocada por una hipermetilación en los islotes CpG, asociándose esta represión con niveles disminuidos de su proteína (*Abdolmaleky y col, 2004, Grayson y col, 2005; Guidotti y col, 2007*). Estudios recientes han demostrado que el A β es capaz ejercer regulación epigénica a través de la metilación del DNA, la modulación de la unión de histonas y otros mecanismos (*Lithner y col, 2013; Hodgson y col, 2013*). En este campo, queda por analizar si el péptido A β sería capaz de inducir modificaciones sobre la región promotora de la reelina.

Otros aspectos novedosos y relevantes que se pueden deducir de nuestro trabajo (*Balmaceda y col, 2013*) están relacionados con la regulación autocrina de la señal de la reelina, un mecanismo regulatorio casi inexplorado para la reelina, por considerarse casi exclusivamente su efecto paracrino distal. Nuestros datos indican la conveniencia de examinar la regulación de reelina en neuronas receptoras de su señal, algo que no había recibido mayor atención hasta la fecha.

En resumen, sostenemos que los resultados recogidos en esta Tesis contribuyen a esclarecer que en cerebros de personas con la EA existe un déficit en la señalización inducida por la reelina, a pesar de su sobreexpresión. Este defecto en la función de la reelina parece estar promovido por el A β , y conduce a una hiperfosforilación de la proteína tau. En este sentido, otros ligandos alternativos de ApoER2 pueden participar también en esta falta de balance adecuado de la vía de señalización de reelina. Así, se sabe que precisamente la isoforma ApoE4, que representa el mayor factor de riesgo genético de padecer EA (ver *Capítulo 2*), es la variante de ApoE que presenta mayor afinidad de unión por el ApoER2 (*D'Arcangelo y col, 1999*); por lo que representaría un mayor competidor para la reelina en su interacción por el receptor. También, en relación con las proteínas que resultan ser relevantes en el desarrollo del Alzheimer, hemos descubierto que la PS1 interviene directamente en la regulación de la reelina mediante el procesamiento del ApoER2.

El mayor conocimiento de todas estas interacciones, y de las alteraciones de las mismas en la condición patológica, podría contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos que cooperan en el progreso de la EA. Las rutas celulares y moleculares donde interviene la reelina aparecen directamente asociadas con las proteínas implicadas en las lesiones características de la EA, por lo que una ampliación de los conocimientos de esta glicoproteína y su regulación podría contribuir positivamente en el desarrollo de terapias que ayuden a paliar el deterioro que se produce durante el progreso de la EA.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales que se recogen en esta Tesis se resumen en los siguientes puntos:

- La reelina que se expresa en presencia del péptido amiloide A β muestra una glicosilación alterada, de manera semejante a aquella caracterizada en la reelina extraída de cerebro de personas con la EA. Esta glicoforma alterada se presenta en agregados oligoméricos en lugar de dímeros, que son las formas funcionales de reelina.
- La reelina expresada en presencia del péptido A β muestra una menor afinidad de unión por el ApoER2 en ensayos *in vitro*, lo que comprometería la activación de la cascada de señalización reelina.
- Las glicoformas de la reelina expresadas en presencia del péptido A β fallan en activar la fosforilación de la proteína adaptadora intracelular Dab1 y, en consecuencia, en inactivar la quinasa GSK-3 β , lo que conduce a un aumento de la fosforilación de la proteína tau.
- La presencia de una reelina alterada aumenta los niveles de 14-3-3, una proteína que favorece la activación de la quinasa GSK-3 β y, por lo tanto, también favorece el incremento en la fosforilación de tau.
- La unión de la reelina al ApoER2 induce el procesamiento del receptor y la generación de un fragmento soluble extracelular, caracterizado en ensayos *in vitro*.
- En LCR *post mortem* de personas con la EA, los fragmentos proteolíticos solubles del ApoER2 se encuentran disminuidos respecto a los niveles determinados en sujetos sin demencia.
- En corteza de ratones *knock-out* de PS1 donde la actividad γ -secretasa está disminuida, la expresión de la reelina aumenta.

- En el modelo de línea neuronal SH-SY5Y, confirmamos el papel de la actividad γ -secretasa en el procesamiento del receptor ApoER2; y conseguimos modular los niveles proteicos de reelina por sobreexpresión del receptor o inhibición de su procesamiento.
- El fragmento intracelular de ApoER2 generado por el procesamiento de la γ -secretasa se transloca al núcleo celular, donde interacciona directamente con la región promotora del gen de la reelina y modula negativamente su actividad transcripcional.



8. APÉNDICE

Migración neuronal: El papel de la reelina

La formación en capas o estratos de la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario ocurre mediante migraciones celulares que están reguladas por la reelina. Estos movimientos de migración celular permite la formación de estructuras laminadas, tales como la neocorteza, el hipocampo y el cerebelo. La formación de laminaciones, son indispensables para crear redes neuronales funcionales. Durante el desarrollo embrionario cerebral la reelina es sintetizada por células *Cajal-Retzius* que están contenidas en las capas superficiales (zona marginal) de la corteza cerebral, por células *granulares* de la capa granular externa del cerebelo y células granulares del *estrato lacunosum molecular* del hipocampo (Alcantara y col, 1998; Schiffmann y col, 1997; D'Arcangelo y col, 1995; Ogawa y col, 1995).

Desarrollo de la corteza

La mejor función caracterizada de la reelina a nivel embrionario es el control que ejerce sobre la migración radial de neuronas. Este tipo de movimiento radial ocurre mediado por células de la denominada glía radial, y conduce a la formación de capas (placas) celulares que serán funcional y morfológicamente diferentes. En la neocorteza las neuronas nacen en la zona ventricular por división asimétrica comenzando a migrar hacia la superficie pial, formando la primer placa, llamada pre-placa (*Figura 10.A*). Estas neuronas jóvenes, migran de forma radial hacia la superficie pial dividiendo a la pre-placa en dos (*Figura 10.B*). Así, la capa más profunda forma la llamada *sub-placa* y se diferencia de una capa más superficial, llamada *zona marginal*, que contiene células *Cajal-Retzius* productoras de reelina, además de otras células que formarán las futuras capas. Desde la zona marginal las células *Cajal-Retzius* ejecutarán funciones cruciales para una corticogénesis normal, que involucra la síntesis y secreción de la reelina. A continuación, cada nuevo grupo de nuevas células, migrarán sobrepasando las capas antiguas a través de la zona marginal (*Figura 10 C-D-E*) y formarán las típicas 6 capas celulares de la corteza de mamíferos en un modelo "dentro-fuera" (*Figura 10 F*) (Angevine y Sidman, 1961).

La reelina ejerce diferentes efectos en la formación de la capa cortical:

- Favorece la división de la pre-placa mediante la repulsión que surge en las neuronas de la sub-placa.
- Actúa como quimioattractora de neuronas: la reelina es sintetizada en el sitio que será el destino final de las neuronas que estén migrando, y esto favorece la migración de

cuerpos neuronales desde las zonas mas profundas de la corteza en formación (Gilmore y Herrup, 2000).

Asimismo, la reelina detiene la migración neuronal en la zona marginal luego de que se une a sus receptores (VLDLR y ApoER2) presentes en la membrana de las neuronas que están migrando. Éstos receptores se expresan de manera selectiva en las neuronas migratorias (aunque también han sido indentificados en la glía radial; ver Luque y col, 2003). La unión de reelina ya sea a uno u otro receptor, puede ejercer diferentes efectos en la migración, que influyen en la formación de las capas corticales. Se ha observado que los ratones deficientes de VLDLR la falta de dicho receptor interrumpe la migración de neuronas jóvenes; mientras que en ratones deficientes en ApoER2 la migración de neuronas tardías resulta mas afectada. Esto sugiere que los efectos de la reelina pueden ser diferentes según el receptor que traduzca su señal (Hack y col, 2002). La unión de la reelina a sus receptores, desata una cascada de señalización en la célula migratoria que induce su diferenciación y distribución en las diferentes capas (Dulabon y col, 2000).

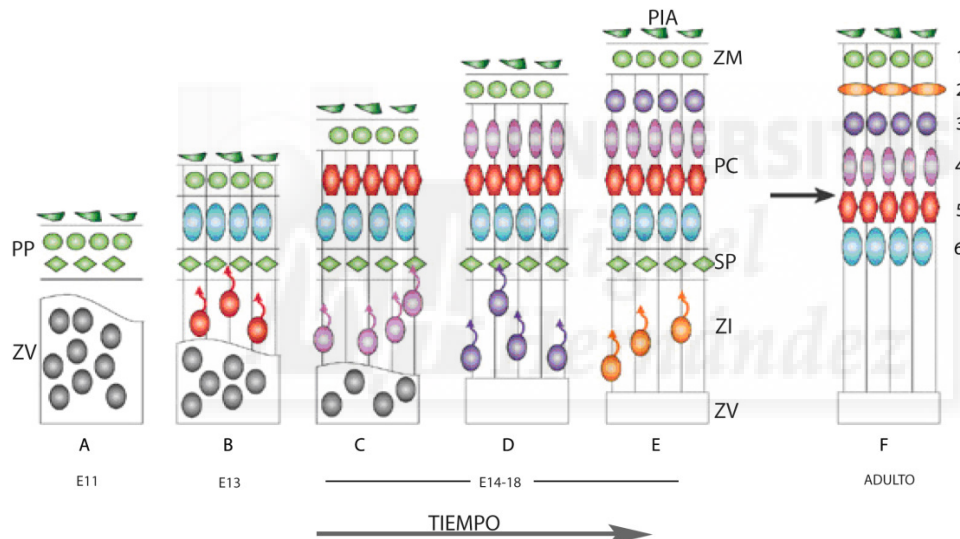


Figura 10: La organización de la neocorteza: Durante el desarrollo embrionario, la migración radial forma la capa neocortical. La migración radial de las neuronas ocurre a lo largo de la glía radial (barras verticales). La migración ocurre desde las zonas germinales (zonas profundas) hacia las zonas corticales mas superficiales. La zona ventricular (ZV) es la zona germinativa y esta compuesta por los progenitores multipotentes de células neuronales. **A)** En embriones de ratón de 11 días (E11), las neuronas post-mitóticas que migran desde la ZV hacia la superficie de la pía madre forman la preplaca (PP), que contiene células Cajal Retzius reelina-positivas, entre otras. **B)** En embriones de 13 días (E13), una segunda tanda de células neuronales migran a través de la zona intermedia (ZI) y divide a la preplaca en la placa de la zona marginal (ZM), donde quedan las células Cajal Retzius, y la subplaca (SP). Entre estas dos placas, se genera la placa cortical (PC). **C-D-E)** En embriones de 14-18 días, las neuronas se expanden en la placa cortical en un modelo “dentro-fuera” en donde cada neurona pasa desde las capas más profundas y se ubica por debajo de la zona marginal para generar el modelo dentro-fuera. **F)** Al alcanzar la fase adulta, la subplaca degenera y forma la 6ª capa de la neocorteza. Las capas neocorticales, serán funcional y morfológicamente diferentes. 1 a 6 representan las 6 placas corticales. Figura adaptada de Gupta y col, 2002.

La disrupción en la producción de reelina en estadios claves del desarrollo embrionario, o la alteración de su cascada de señalización, tiene como consecuencia efectos morfológicos devastadores que llevan a una profunda disrupción cognitiva postnatal (*Trommsdorff y col, 1999; Howel y col, 1997a*). Estos efectos pone en evidencia el importante papel de la reelina en la formación de la corteza cerebral.

El ratón reeler

En 1948, en el Instituto de Genética Animal de Edimburgo, se encontró un grupo de ratones que presentaban una alteración severa en los movimientos motores. Éstos ratones portaban una mutación autosómica recesiva surgida de manera espontánea, conocida como la mutación *reeler* (*Falconer, 1951*). Las evidencias fenotípicas de los ratones *reeler* consisten en déficit motores severos caracterizados por una marcha descoordinada e inestable, temblores severos, ataxia y muerte temprana por lo general alrededor de la época del destete (*Sheldon y col, 1997; Ware y col, 1997*). Histológicamente, los ratones *reeler* muestran severas perturbaciones en la distribución de las capas corticales, en la laminación del hipocampo y un cerebelo con escasa o totalmente carente laminación (*Hamburgh, 1963*) (*Figura 11 B*). En los ratones *reeler*, las neuronas se generan en las zonas germinativas de igual forma que el ratón con genotipo salvaje. Sin embargo, estas neuronas presentan un posicionamiento celular desordenado en las estructuras laminadas del cerebro: corteza, hipocampo y cerebelo. En la corteza del ratón *reeler*, las neuronas que migran no son capaces de dividir la preplaca y generan una estructura llamada superplaca, que muestra una distribución *dentro-fuera* interrumpida en la que las neuronas están apiladas y se encuentran en una disposición invertida respecto a las 6 capas celulares de la corteza con genotipo salvaje (*Figura 11 A*) (*Caviness y Sidman, 1973; Lambert de Rouvroit y Goffinet 1998*).

Hasta finales del siglo pasado no se identificó a la reelina como la proteína defectiva en el ratón *reeler* (*D'Arcangelo y col, 1995; Hirosune y col, 1995; Ogawa y col 1995*). Es interesante señalar que tanto los ratones deficientes en ambos receptores de reelina, así como en el adaptador intracelular Dab1 presentan también un fenotipo similar a *reeler* (*Sheldon y col, 1997; Howell y col, 1997a; Trommsdorff y col, 1999*). En conjunto, este tipo de mutaciones pone en evidencia de que la reelina y los elementos de su ruta de señalización son cruciales durante el desarrollo de las estructuras corticales del cerebro.

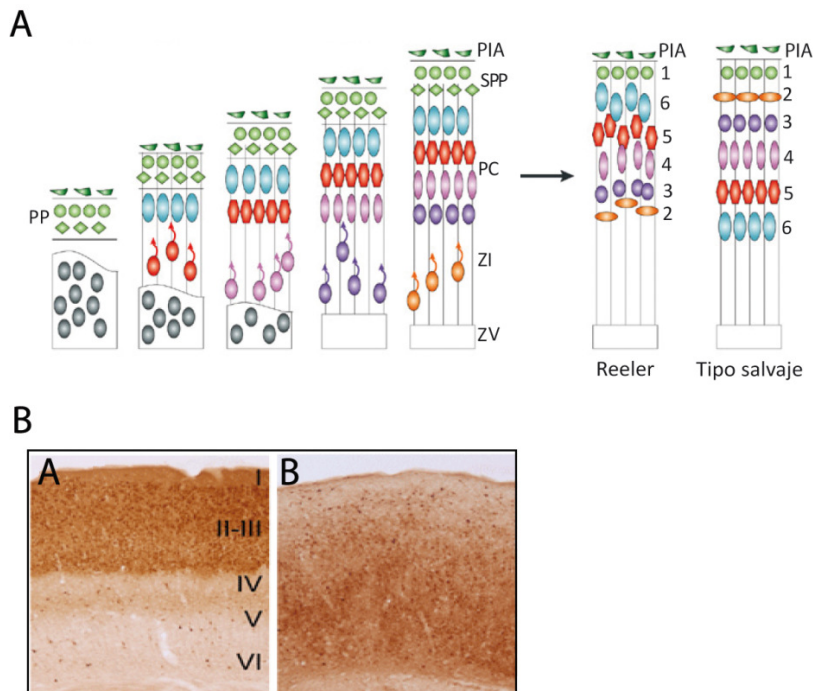


Figura 11 A) Representación de la citoarquitectura del ratón *reeler*. En ratones con mutaciones *reeler*, y tipo *reeler*, la cantidad de neuronas es normal, y existe una formación normal de la preplaca (PP). Sin embargo, la preplaca no se divide y forma una estructura llamada superplaca (SPP). Como consecuencia de ésta distribución anómala, no se producen la zona marginal ni la sub-placa. La placa cortical (PC) se forma por debajo de la superplaca quedando con un orden invertido respecto a la placa cortical de ratones con genotipo salvaje. Esto indica que las neuronas tardías son incapaces de migrar a través de sus precursores, se apilan y alteran la distribución neuronal *dentro-fuera*. **B)** Secciones de corteza somatosensorial de ratones de 14 días post-natal con genotipo salvaje (A) y *reeler* (B). La tinción de interneuronas muestra la laminación alterada que se presenta en el ratón tipo *reeler* (escala 300 μ m). PP pre-placa, ZV zona ventricular, ZI zona intermedia, PC placa cortical, SP super placa 1 a 6 representan las 6 placas corticales. Figura adaptada de Gupta y col, 2002, y Pla y col, 2006.

Deficiencia de la reelina en humanos: Lisencefalia con hipoplasia cerebelar

La lisencefalia es un desorden que ocurre en el proceso de migración neuronal durante la gestación. Está caracterizada por la escasa o total ausencia de las circunvoluciones del cerebro que producen una superficie cerebral lisa (Barkovich y col, 2005). Las estructuras cerebrales laminadas presentan una citoarquitectura anómala, dando como resultado la formación de una corteza muy gruesa (10-20 mm en relación a los 4 mm normales). Se han reconocido diferentes tipos de lisencefalia, entre ellas se encuentra la lisencefalia con hipoplasia cerebelar (LCH), que presenta además un escaso desarrollo del cerebelo. Se han reportado 6 subtipos diferentes de LCH, con una clínica heterogénea (Ross y col, 2001). En términos generales, las características fenotípicas de la LCH muestran un engrosamiento de la materia gris cortical, hipoplasia del cerebelo,

marcadamente reducido en volumen y con una laminación alterada, así como una marcada desorganización del hipocampo (*Hong y col, 2000*) Los niños afectados presentan conectividad neuromuscular anormal y linfodema, además de retraso mental, hipotonía, ataxia severa y ataques de apoplejía. Los estudios genéticos de niños afectados con la LCH han revelado la presencia de mutaciones autosómicas recesivas en el gen de la reelina, resultando un déficit en la funcionalidad de esta proteína (*Zaki y col, 2007; Chang y col, 2007*).



9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdolmaleky y col, 2004:* Abdolmaleky HM, Smith CL, Faraone SV, Stone W, Glatt SJ, Tsuang MT. Methyloomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interaction may be through DNA methylation. *Am J Genet B Neuropsychiatr Genet.*, 2004; 127B (1): 51-59.
- Alcantara y col, 1998:* Alcantara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E. Regional and cellular patterns of *reelin* mRNA expresión in the forebrain of the developing and adult Mouse. *J.Neurosci.*, 1998; 18: 7779-99.
- Alonso y col, 1997:* Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997; 94:298-303.
- Alonso y col, 1996:* Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.*, 1996; 2:783-87.
- Angevine y Sidman, 1961:* Angevine JB and Sidman RL. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 1961; 192: 766-68.
- Arnaud y col, 2003:* Arnaud L, Ballif BA, Cooper JA. Regulation of protein tyrosine kinase signaling by substrate degradation during brain development. *Mol Cell Biol.*, 2003; 23: 9293-302.
- Assadi y col, 2003:* Assadi, AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, Quattrocchi CC, Antalfy BA, Sheldon M, Armstrong DD, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G, Clark GD. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet.*, 2003; 35: 270-76.
- Ávila, 2000:* Ávila J. Tau aggregation into fibrillar polymers: taupathies. *FEBS Lett.*, 2000; 476: 89-92.
- Ballatore y col, 2007:* Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.*, 2007; 8(9): 663-72.
- Ballif y col, 2003:* Ballif BA, Arnaud L, Cooper JA. Tyrosine phosphorylation of Disabled-1 is essential for Reelin-stimulated activation of Akt and Src family kinases. *Brain Res Mol Brain Res.*, 2003; 117: 152-59.
- Balmaceda y col, 2013:* Balmaceda V, Cuchillo-Ibáñez I, Pujadas L, García-Ayllón MS, Saura CA, Nimpf J, Soriano E, Sáez-Valero J. ApoER2 processing by presenilin-1 modulates reelin expresión. *FASEB J.*, 2013; doi:10.1096/fj.13-239350fj.13-239350

- Barkovich y col, 2005:* Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*, 2005; 65 (12): 1873-87.
- Beffert y col, 2006:* Beffert U, Durudas A, Weeber E J, Stolt P C, Giehl K M, Sweatt J D, Hammer R E, Herz J. Functional dissection of Reelin signaling by site-directed disruption of disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity. *J Neurosci.*, 2006; 26 (7): 2041–52.
- Beffert y col, 2005:* Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelmann G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J, Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron*, 2005; 47:567–79.
- Beffert y col, 2002:* Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J. Reelin mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem.*, 2002; 277: 49958–64.
- Bergmans y De Strooper, 2010:* Bergmans BA, De Strooper B. Gama secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *The Lancet Neurol.*, 2010; 2 (9): 215- 26.
- Bior y Ballif, 2013:* Bior BK, Ballif BA. Dab1 stabilized its interaction with Cin85 by suppressing Cin85 phosphorylation at serine 687. *FEBS Lett.*, 2013; 587 (1): 60-66.
- Blennow y col, 2006 :* Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2006; 368:387-403.
- Blennow y col, 2012:* Blennow K, Zetterberg H, Fagan AM. Fluid biomarkers in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012; 2: a006221.
- Bock y col, 2004:* Bock HH, Jossin Y, May P, Bergner O, Herz J. Apolipoprotein E receptors are required for reelin-induced proteasomal degradation of the neuronal adaptor protein Disabled-1. *J Biol Chem.*, 2004; 279: 33471-79.
- Borchekt y col, 1996:* Borchekt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D. Familial Alzheimer's disease linked presenilin 1 variants elevate A beta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 1996; 17: 1005-13.
- Botella-López y col, 2010:* Botella-López A, Cuchillo-Ibáñez I, Cotrufo T, Mok SS, Li QX, Barquero MS, Dierssen M, Soriano E, Sáez-Valero J. Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.*, 2010; 37: 682–91.
- Botella-López y Sáez-Valero, 2008:* Botella-López A, Sáez-Valero J. *Alzheimer's Disease and Reelin*. En S. Hosseini Fatemi: Reelin Glycoprotein, Biology, Structure and Roles in Health and Disease. 2008, pp. 401-09. *Springer, New York, U.S.A.*

- Botella-López y col, 2006*: Botella-López A, Burgaya F, Gavín R, García-Ayllón MS, Gómez-Tortosa E, Peña-Casanova J, Ureña JM, Del Río JA, Blesa R, Soriano E, Sáez-Valero J. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2006; 103: 5573–78.
- Brandes y col, 1997*: Brandes C, Novak S, Stockinger W, Herz J, Schneider WJ, Nimpf J: Avian and murine LR8B and human apolipoprotein E receptor 2: differentially spliced products from corresponding genes. *Genomics*, 1997; 42 (2): 185-91.
- Brouwers y col, 2008*: Brouwers N, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann Med.*, 2008; 40: 562-83.
- Burdick y col, 1992*: Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C., Glabe C: Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem.*, 1992; 267: 546-54.
- Campion y col, 1999*: Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Drapoux F, Brice A, Frebourg T. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.*, 1999; 65: 664-70.
- Carson y Turner, 2002*: Carson JA, Turner AJ. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases. *J Neurochem.*, 2002; 81: 1-8.
- Caviness y Sidman, 1973*: Caviness VS, Sidman RL. Time of origin or corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol.*, 1973; 148: 141-51.
- Chameau y col, 2009*: Chameau P, Inta D, Vitalis T, Monyer H, Wadman WJ, Van Hooft JA. The N-terminal region of reelin regulates postnatal dendritic maturation of cortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2009; 106 (17): 7227-32
- Chang y col, 2007*: Chang BS, Duzcan F, Kim S, Cinbis M, Aggarwal A, Apse KA, Ozdel O, Atmaca M, Zencir S, Bagci H, Walsh CA. The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr. Genet.*, 2007; 144 (1): 58-63.
- Chávez-Gutiérrez y col, 2012*: Chávez- Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, Lismont S, Zhou L, Van Cleynenbreugel S, Esselmann H, Wiltfang J, Serneels L, Karran E, Gijssen H, Schymkowitz J, Rousseau F, Broersen K, De Strooper B. The mechanisms of gamma secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.*, 2012; 31(10): 2261-74.
- Chen y col, 2005*: Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS., Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J. Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci.*, 2005; 25:8209–16.

- Chen y col, 2004: Chen Y, Ochalski PG, Tran TS, Sahir N, Schubert M, Pramatarova A, Howell BW. Interaction between Dab1 and Crk II is promoted by reelin signaling. *J Cell Sci.*, 2004; 117: 4527-36.
- Chin y col, 2007: Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L. Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 2007; 27: 2727-33.
- Corder y col, 1993: Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993; 261: 921-23.
- Cuchillo-Ibáñez y col, 2013: Cuchillo-Ibáñez I, Balmaceda V, Botella-López A, Rabano A, Ávila J, Sáez-Valero J. Beta amyloid impairs reelin signaling. *PlosOne*, 2013; 8 (8): e72297.
- Cuchillo y col, 2008: Cuchillo-Ibáñez I, Seereeram A, Byers HL, Leung KY, Eard MA, Anderton BH, Hanger DP. Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB.*, 2008; 22: (9): 3186-95.
- Cuitino y col, 2005: Cuitino L, Matute R, Retamal C, Bu G, Inestrosa NC, Marzolo MP. ApoER2 is endocytosed by a clathrin-mediated process involving the adaptor protein Dab2 independent of its Rafts' association. *Traffic*, 2005; 6 (9): 820-38.
- D'Arcangelo y col, 1999: D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*, 1999; 24: 471-79.
- D'Arcangelo y col, 1997: D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T. Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci.*, 1997; 17: 23-31.
- D'Arcangelo y col, 1995: D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 1995; 374: 719-23.
- De Bergeyck y col, 1997: De Bergeyck V, Nakajima K, Lambert de Roucroit C, Naerhuyzen B, Goffinet AM, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K. A truncated Relin protein is produced but not secreted in the "Orleans" reeler mutation. *Brain Res Mol Brain Res.*, 1997; 50 (1-2): 85-90.
- Del Rio y col, 1997: Del Rio JA, Heimrich B, Borrel V, Forster E, Drakew A, Alcantara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connection. *Nature*, 1997; 385(6611): 70-74.
- De Strooper y col, 2012: De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012; 2: a006304.

- De Strooper, 2007*: De Strooper B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.*, 2007; 8: 141-46.
- Doehner y col, 2010*: Doehner J, Madhusudan A, Konietzko U, Fritschy JM, Knuesel I. Co-localization of Reelin and proteolytic AbetaPP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice. *J Alzheimers Dis.*, 2010; 19: 1339-57.
- Duit y col, 2010*: Duit S, Mayer H, Blake SM, Schneider WJ, Nimpf J. Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in Reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. *J Biol Chem.*, 2010; 285: 4896–908.
- Dulabon y col, 2000*: Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh, CA, Kreidberg J A, Anton ES. Reelin binds alpha-3 beta-1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, 2000; 27: 33-44.
- Durakoglulugil y col, 2009*. Durakoglulugil MS, Chen Y, White CL, Kavalali ET, Herz J. Reelin signaling antagonizes Beta amyloid at the synapsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2009; 37 (106): 15938-43.
- Falconer, 1951*: Falconer D. Two new mutants, “trembler” and “reeler”, with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *J Ge´net. (Paris)*, 1951; 192–201.
- Fatemi y col, 2005*: Fatemi SH, Snow AV, Stary JM, Araghi-Niknam M, Reutiman TJ, Lee S, Brooks AI, Pearce DA. Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry.*, 2005; 57: 777–87.
- Fatemi y col, 2001*: Fatemi SH, Kroll JL, Stary JM. Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport.*, 2001; 12: 3209–15.
- Ferreira y col, 2006*: Ferreira ST, De Felice FG, Chapeaurouge A. Metastable, partially folded states in the productive folding and in the misfolding and amyloid aggregation of proteins. *Cell Biochem Biophys.*, 2006; 44 (3): 539-48.
- Fodero y col, 2002*: Fodero LR, Sáez-Valero J, McLean CA, Martins RN, Beyreuther K, Masters CL, Robertson TA, Small DH. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in APP (SW) Tg2576 transgenic mice occurs prior to amyloid plaque deposition. *J Neurochem.*, 2002; 81: 441-48.
- Folson y Fatemi, 2013*: Folsom TD, Fatemi SH. The involvement of reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacol.*, 2013; 68:122-35.
- Fragan y col, 2007*: Fragan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun, MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol.*, 2007; 64: 343–49.
- Frisoni y Blennow, 2013*: Frisoni GB, Blennow K. Biomarkers for Alzheimer's: the sequel of an original model. *Lancet Neurol.*, 2013; 2: 126-28.

- Frykman y col, 1995:* Frykman PK, Brown MS, Yamamoto T, Goldstein JL, Herz J. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1995; 92: 8453–57.
- García-Miranda y col, 2010:* García-Miranda P, Peral MJ, Ilundain AA. Rat small intestine expresses the reelin-Disabled-1 signalling pathway. *Exp Physiol.*, 2010; 95 (4): 498–507.
- Ghosh y col, 2012:* Ghosh AK, Brindisi M, Tang J. Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 2012; 120 Suppl 1: 71-83.
- Gilmore y Herrup, 2000:* Gilmore EC and Herrup K. Cortical development: receiving reelin. *Curr. Biol.*, 2000; 10: R162-R166.
- Goate y col, 1991:* Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991; 349: 704-06.
- Grayson y col, 2005:* Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, Costa E. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2005; 102: 9341-46.
- Groc y col, 2007:* Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Terrier D, Manzoni OJ, Chavis P. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci.*, 2007; 27: 10165–75.
- Guevara y col, 1998:* Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vazquez L, Luna J, Perry G, Mena R. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 1998; 57: 905-14.
- Guidotti y col, 2007:* Guidotti A, Ruzicka W, Grayson DR, Veldic M, Pinna G, Davis JM, Costa E. S-adenosyl methionine and DNA methyltransferase-1 mRNA overexpression in psychosis. *Neuroreport*, 2007; 18: 57-60.
- Gupta y col, 2002:* Gupta A, Huei-Tsai L, Wynshhaw-Boris A. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Gen.*, 2002; 3: 342-55.
- Haapasalo y Kovacs, 2011:* Haapasalo A, Kovacs DM. The many substrates of presenilin/ γ secretase. *J Alzheimer Dis.*, 2011; 25 (1): 3-28.
- Haass y col, 2012:* Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012; 2 (5): a006270.
- Haass y col, 1992:* Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB. Amyloid beta-peptide is produced by culture cells during normal metabolism. *Nature*, 1992; 359: 322-25.

- Hack y col, 2007:* Hack I, Hellwig S, Junghans D, Brunne B, Bock HH, Zhao S, Frotscher M. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development*, 2007; 134: 3883-91.
- Hack y col, 2002:* Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat. Neurosci.*, 2002; 5: 939-45.
- Hamburgh, 1963:* Hamburgh M. Analysis of the postnatal developmental effects of "Reeler" a neurological mutation in mice. A study in developmental genetics. *Dev Biol.*, 1963; 19: 165–85.
- Hampel y col, 2011:* Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frölich L, Riepe MW, Dodel, Leyhe T, Bertram, Hoffmann W, Faltraco F. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol.*, 2011; 95(4): 718-28.
- Hardy y Higgins, 1992:* Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992; 256: 184–85.
- Hardy y Selkoe, 2002:* Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002; 297: 353-56.
- Hartigan y Johnson, 1998:* Hartigan JA, Johnson GVW. Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *Alzheimer Dis Rev.*, 1998; 3: 125-41.
- Herms y col, 2004:* Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretzschmar H, Sisodia S, Müller. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.*, 2004; 23: 4106-15.
- Hernández y Ávila, 2007:* Hernández F, Ávila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci.*, 2007; 64: (17): 2219-33
- Herring y col, 2012:* Herring A, Donath A, Steiner KM, Widera MP, Hamzehian S, Kanakis D, Kölbl K, Elali A, Hermann DM, Paulus W, Kenyvani K. Reelin Depletion is an Early Phenomenon of Alzheimer's Pathology. *J Alzheimers Dis.*, 2012; 30: 963–79.
- Herz y Chen, 2006:* Herz J, Chen Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.*, 2006; 7: 850–59.
- Herz y Willnow, 1994:* Herz J, Willnow T E (1994). Functions of the LDL receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci.*, 1994; 737: 14–19.
- Hiesberger y col, 1999:* Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, 1999; 24: 481-89.
- Hirotsune y col, 1995:* Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S, Nakao K, Katsuki M, Hayashizaki Y

The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet.*, 1995; 10: 77–83.

Hisanaga y col, 2012: Hisanaga A, Morishita S, Suzuki K, Sasaki K, Koie M, Kohno T, Hattori M. A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett.*, 2012; 586: 3349–53.

Hoareau y col, 2008: Hoareau C, Borrell V, Soriano E, Krebs MO, Prochiantz A, Allinquant B. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain antagonizes reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. *Neurobiol Aging.*, 2008; 29(4): 542-53.

Hodgson y col, 2013: Hodgson N, Trivedi M, Moratore C, Li S, Deth R. Soluble oligomers of Amyloid β cause changes in redox state DNA methylation and gene transcription by inhibiting EAAT3 mediated cysteine uptake. *J Alzheimer Dis.*, 2013; 36 (1): 1997-209.

Hoe y col, 2009: Hoe HS, Lee KJ, Carney RS, Lee J, Markova A, Lee JY, Howell BW, Hyman BT, Pak DTS, Bu G, Rebeck GW. Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J Neurosci.*, 2009; 29: 7459–73.

Hoe y col, 2007: Hoe HA, Cooper MJ, Burns MP, Lewis PA, van der Drug M, Chakraborty G, Cartagena CM, Pak DT, Cookson MR, Rebeck GW. The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *J. Neurosci.*, 2007; 27 (40): 10895-905.

Hoe y col, 2006a: Hoe HS, Tran TS, Matsuoka Y, Howell BW, Rebeck GW. DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. *J Biol Chem.*, 2006; 281: 35176–85.

Hoe y col, 2006b: Hoe HS, Pocivavsek A, Chakraborty G, Fu Z, Vicini S, Ehlers MD, Rebeck GW. Apolipoprotein E receptor 2 interactions with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.*, 2006; 281 (6): 3425–31.

Hoe y col, 2006c: Hoe HS, Magill LA, Guenette S, Fu Z, Vicini S, Rebeck GW. FE65 interaction with the ApoE receptor ApoER2. *J Biol Chem.*, 2006; 281 (34): 24521-30.

Hoe y Rebeck, 2005: Hoe HS, Rebeck GW: Regulation of ApoE receptor proteolysis by ligand binding. *Brain Res Mol Brain Res.*, 2005; 137(1-2): 31-39.

Hong y col, 2000: Hong SS, Shugart YY Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutation. *Nat Genet.*, 2000; 26 (1): 93-96.

Holtzman y col., 2000: Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D and Paul SM. Apolipoprotein E isoforma- dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a Mouse modelo f Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U SA*, 2000; 97: 2892-97.

- Howell y col, 2000: Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA. Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr Biol.*, 2000; 10: 877-85.
- Howell y col, 1999: Howell BW, Herrick TM, Cooper JA. Reelin-induced tryosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.*, 1999; 13: 643-48.
- Howell y col, 1997a: Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*, 1997; 389: 733-37.
- Howell y col, 1997b: Howell BW, Gertler FB, Cooper JA. Mouse disabled (mDab1): A Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J.*, 1997; 16: 121-32.
- Iannuzzi y col, 2013: Iannuzzi C, Maritato R, Irace G, Sirangelo I. Glycation accelerates fibrillization of the amyloidogenic W7FW14F apomyoglobin. *PlosOne*, 2013; 8(12): e80768.
- Ichihara y col, 2001: Ichihara H, Jingami H, Toh H. Three novel repetitive units of reelin *Brain Res Mol Brain Res.*, 2001; 97: 190-93.
- Ignatova y col, 2004: Ignatova N, Sindic CJ, Goffinet AM. Characterization of the various forms of the Reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. *Neurobiol Dis.*, 2004;15: 326-30.
- Iijima y col, 1998: Iijima H, Miyazawa M, Sakai J, Magoori K, Ito MR, Suzuki H, Nose M, Kawarabayasi Y, Yamamoto TT. Expression and characterization of a very low density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *J Biochem.*, 1998; 124 (4): 747-55.
- Ikeda y Terashima, 1997: Ikeda Y, Terashima T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn.*, 1997; 210: 157-72.
- Invernizzi y col, 2012: Invernizzi G, Papaleo E, Sabate R, Ventura S. Protein aggregation: mechanisms and functional consequences. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012; 44 (9): 1541-54.
- Iqbal y col, 2005: Iqbal K, Alonso AC, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer's disease and others tauopathies. *Biochim Biophys Acta.*, 2005; 1739:198-210.
- Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008: Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med.*, 2008; 12 (21):38-55.
- Jarrett y col, 1993: Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 1993; 32: 4693-97.
- Johnson y Stoothoff, 2004: Johnson GVW, Stoothoff WH. Tay phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal Cell Sci.*, 2004; 117: 5721-29.

- Jossin y col, 2004: Jossin Y, Ignatova N, Heisberger T, Herz J, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. The central fragment of reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its functions during cortical plate development. *J Neurosci.*, 2004; 24: 514-21.
- Jossin y col, 2003: Jossin Y, Ogawa M, Metin C, Tissir F, Goffinet AM. Inhibition of SRC family kinases and non-classical protein kinases C induce a reeler-like malformation of cortical plate development. *J Neurosci.*, 2003; 23: 9953–59.
- Kanninen y col, 2004: Kanninen K, Goldsteins G, Auriola S, Alafuzoff I, Koistinaho J. Glycosylation changes in Alzheimer's disease as revealed by a proteomic approach. *Neurosci Lett.*, 2004; 3367(2): 235-40.
- Karas y col, 2004: Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, Visser PJ, van Schiindel RA, Fox NC, Barkhof F. Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 2004; 23: 708-16.
- Khatoon y col, 1994: Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Levels of normal and abnormal phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett.*, 1994; 351: 80-84.
- Kim y col, 1996: Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T. Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem.*, 1996; 271 (14): 8373–80.
- Kimberly y col, 2001: Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem.*, 2001; 276: 40288–92.
- Knuesel, 2010: Knuesel I. Reelin-mediated signalling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.*, 2010; 91 (4): 257-74.
- Knuesel y col, 2009: Knuesel I, Nyffeler M, Morméde C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, Iamero FM, Marighetto A, Feldon J. Age-related accumulation of reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiol Aging.*, 2009; 30 (5): 697-716.
- Koch y col, 2002: Koch S, Strasser V, Hauser C, Fasching D, Brandes C, Bajari TM, Schneider W J, Nimpf J. A secreted soluble form of ApoE receptor 2 acts as a dominant-negative receptor and inhibits Reelin signaling. *EMBO J.*, 2002; 21 (22): 5996–6004.
- Kocherhans y col, 2010: Kocherhans S, Madhusudan A, Doehner J, Breu KS, Nitsch RM, Fritschy JM, Knuesel I. Reduced reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.*, 2010; 30 (27): 9228-40.

- Kohno y col, 2009: Kohno S, Kohno T, Nakano Y, Suzuki K, Ishii M, Tagami H, Baba A, Hattori M. Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2009; 380: 93–97.
- Kopke y col, 1993: Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem.*, 1993; 268: 24374-84.
- Kramer y col, 2011: Kramer PL, Xu H, Woltjer RL, Westaway SK, Clark D, Erten-Lyons D, Kaye JA, Welsh-Bohmer KA, Troncoso JC, Markesbery WR, Petersen RC, Turner RS, Kukull WA, Bennett DA, Galasko D, Morris JC, Ott J. Alzheimer disease pathology in cognitively healthy elderly: a genome-wide study. *Neurobiol Aging.*, 2011; 32: 2113-22.
- Krstic y col, 2013: Krstic D, Pfister S, Notter T, Knuesel I. Decisive role of Reelin signaling during early stages of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2013; 246:108-16.
- Krstic y col, 2012: Krstic D, Rodriguez M, Knuesel I. Regulated proteolytic processing of reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PlosOne*, 2012; 7 (10): e47793.
- Kubo y col, 2002: Kubo K, Mikoshiba K, Nakajima K. Secreted reelin molecules form homodimers. *Neurosci Res.*, 2002; 43: 381-88.
- Lambert de Rouvroit y col, 1999: Lambert de Rouvroit C, de Bergeyck V, Cortvrindt C, Bar I, Eeckhout Y, Goffinet AM. Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp Neurol.*, 1999; 156: 214–17.
- Lambert de Rouvroit y Goffinet, 1998: Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. The reeler mouse as a model of brain development. *Adv. Anat. Embryol Cell Biol.*, 1998; 150: 1-106.
- Larios y Marzolo, 2012: Larios JA, Marzolo MP. Novel aspects of the apolipoprotein-E receptor family: regulation and functional role of their proteolytic processing. *Front. Biol.*, 2012; 7 (2): 113–43.
- Levenson y Sweatt, 2005: Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci.*, 2005; 6: 108-18.
- Lithner y col, 2013: Lithner CU, Lacor PN, Zhao WQ, Mustafiz T, Klein WL, Sweatt JD, Hernandez CM. Disruption of neocortical histone H3 homeostasis by soluble A β : Implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*, 2013; 34 (9): 2081-90.
- Lleó y Saura, 2011: Lleó A, Saura CA. γ -secretase substrates and their implications for drug development in Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem.*, 2011; 11: 1513-27.
- Lovestone y Reynolds, 1997: Lovestone S, Reynolds CH. The phosphorylations of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neurosci.*, 1997; 78: 309-24.

- Lui y col, 2009: Liu Q, Zhang J, Tran H, Verbeek M M, Reiss K, Estus S, Bu G. LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol Neurodegener.*, 2009; 4: 17.
- Luque y col, 2003: Luque JM, Morante-Oria J, Fairen A. Localization of ApoER2, VLDLr and Dab1 in radial glia: groundwork for a new model of reelin action during cortical development. *Brain Res Dev Brain Res.*, 2003; 140 (2):195-203.
- Madhusudan y col, 2009: Madhusudan A, Sidler C, Knuesel I. Accumulation of reelin-positive plaques is accompanied by a decline in basal forebrain projection neurons during normal aging. *Eur J Neurosci.*, 2009; 30: 1064-76.
- Mann 1988: Mann DM. The pathological association between Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.*, 1988; 43: 99-136.
- Mann y col, 1984: Mann DM, Yates PO, Marcyniuk B. Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age form and age related continuum of pathological changes. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 1984; 10: 185-207.
- Marcinkiewicz y Seidah, 2000: Marcinkiewicz M Seidah NG. Coordinated expression of β -amyloid precursor protein and the putative β -secretase BACE and α -secretase ADAM 10 in mouse and human brain. *J. Neurochem.*, 2000; 75: 2133-43.
- Martensen y col, 1997: Martensen PM, Oka K, Christensen L, Rettenberger PM, Petersen HH, Christensen A, Chan L, Heegaard CW, Andreasen PA. Breast carcinoma epithelial cells express a very low-density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked glycosylation domain encoded by exon 16, but with full binding activity for serine proteinase/serpin complexes and Mr-40,000 receptor-associated protein. *Eur J Biochem.*, 1997; 248 (2): 583-91.
- Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002: Martínez-Cerdeño V, Clascá F. Reelin immunoreactivity in the adult neocortex: a comparative study in rodents, carnivores, and non-human primates. *Brain Res Bull.*, 2002; 1,57(3-4): 485-88
- Marzolo y Farfán, 2011: Marzolo M P, Farfán P. New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression. *Biol Res.*, 2011; 44 (1): 89-105.
- May y col, 2003: May P, Bock HH, Nimpf J, Herz J. Differential glycosylation regulates processing of lipoprotein receptors by γ -secretase. *J Biol Chem.*, 2003; 278 (39): 37386-92.
- May y col, 2002: May P, Reddy YK, Herz J. Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem.*, 2002; 277 (21): 18736-43.
- Mayer y col, 2006: Mayer H, Hauser C, Schneider WJ, Nimpf J. Reconstitution of the Reelin signaling pathway in fibroblasts demonstrates that Dab1 phosphorylation is independent of receptor localization in lipid rafts. *Mol Cell Biol.*, 2006; 26 (1): 19-27.

- Mayeux, 2003: Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.*, 2003; 26: 81-104.
- Minami y col, 2011: Minami SS, Hoe HS, Rebeck GW. Fyn kinase regulates the association between amyloid precursor protein and Dab1 by promoting their localization to detergent-resistant membranes. *J Neurochem.*, 2011; 118 (5): 879-90.
- Miyata y col, 1997: Miyata T, Nakajima K, Mikoshiba K, Ogawa M. Regulation of Purkinje cell alignment by reelin as revealed with CR-50 antibody. *J Neurosci.*, 1997; 17: 3599–609.
- Moore y col, 2012: Moore BD, Chakrabarty P, Levites Y, Kukar TL, Baine AM, Moroni T, Ladd TB, Das P, Dickson DW, Golde TE. Overlapping profiles of Ab peptides in the Alzheimer's disease and pathological aging brains. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2012; 4(3):18.
- Mortimer y col, 2003: Mortimer JA, Snowdon DA, Markesbery WR. Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study. *J Clin Exp Neuropsychol.*, 2003; 25: 671-79.
- Nakajima y col, 1997: Nakajima K, Mikoshiba K, Miyata T, Kudo C, Ogawa M. Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAb against reelin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1997; 94: 8196–201.
- Nakano y col, 2007: Nakano Y, Kohno T, Hibi T, Kohno S, Baba A, Mikoshiba K, Nakajima K, Hattori M. The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. *J Biol Chem.*, 2007; 282: 20544–52.
- Nalivaeva y Turner, 2013: Nalivaeva NN, Turner AJ. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett.*, 2013; 587: 2046-54.
- Notter y Knuesel, 2013: Notter T, Knuesel I. Reelin immunoreactivity in neuritic varicosities in the human hippocampal formation of non-demented subjects and Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol Commun.*, 2013;1(1):27.
- Ogawa y col, 1995: Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*, 1995; 14: 899–912.
- Olzscha y col, 2011: Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F, Vabulas RM. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins. *Cell*, 2011; 144 (1): 67-78.
- Pei y col, 1999: Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF. Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 1999; 58: 1010–19.

- Pei y col, 1998: Pei JJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Bogdanovic N, Winblad B, Cowburn RF. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res.*, 1998; 797: 267–77.
- Pesold y col, 1998: Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A et al. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing γ aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1998; 95: 3221-26.
- Pigino y col, 2009: Pigino F, Moefini G, Atagi Y, Yu C, Junbauer L, LaDu M, Busciglio J, Brady S. Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2009; 106(14): 5907-12.
- Pla y col, 2006: Pla R, Borrell V, Flames N, Marín O. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of reelin signaling. *J. Neurosci.*, 2006; 26 (6): 6924-34.
- Poirier y col, 1993: Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrad P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, 1993; 342: 697-99.
- Portelius y col, 2010: Portelius E, Bogdanovic N, Gustavsson MK, Volkman I, Brinkmalm G, Zetterberg H, Winblad B, Blennow K. Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 2010; 120 (2): 185-93
- Pujadas y col, 2010: Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira C M, Rossi D, deLecea L, Martínez A, Delgado-García J M, Soriano E. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci.*, 2010; 30(13): 4636–49.
- Qiu y Weeber, 2007: Qiu S, Weeber EJ. Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J. Neurophysiol.*, 2007; 97 (3): 2312-21.
- Qui y col, 2006. Qiu S, Zhao LF, Korwek KM, Weeber EJ. Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J Neurosci.*, 2006; 26: 12943–55.
- Raychaudhuri y Mukhopadhyay, 2007: Raychaudhuri M, Mukhopadhyay D. AICD and its adaptors in search of new players. *J Alzheimers Dis.*, 2007; 11: 343-58.
- Riddel y col, 2001: Riddel DR, Sun XM, Stannard AK, Soutar AK, Owen JS. Localization of apolipoprotein E receptor 2 to caveolae in the plasma membrane. *J Lipid Res.*, 2001; 42(6): 998-1002.
- Riddell y col, 1999: Riddell DR, Vinogradov DV, Stannard AK, Chadwick N, Owen JS. Identification and characterization of LRP8 (ApoER2) in human blood platelets. *J Lipid Res.*, 1999; 40 (10): 1925–30.

- Ross y col, 2001: Ross ME, Swanson K, Dobyns WB. Lissencephaly with cerebellar hypoplasia (LCH): a heterogeneous group of cortical malformations. *Neuropediatrics*, 2001; 32 (5): 256-63.
- Sáez-Valero y col, 2003: Sáez-Valero J, Costell M, Sjogren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM. Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.*, 2003; 72: 132-36.
- Sáez-Valero y Small, 2001: Sáez-Valero J, Small DH. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase glycoforms are biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 2001; 3 (3): 323-28.
- Sáez-Valero y col, 1999: Sáez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Small DH. Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 1999; 72 (4): 1600-08.
- Sáez-Valero y col, 1997: Sáez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Masters CL, Small DH. Glycosylation of acetylcholinesterase as diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Lancet*, 1997; 350 (9082): 929.
- Santa María y col, 2010: Santa María I, Ávila J, Rábano A. Differential gene expression analysis of human entorhinal cortex support a possible role of some extracellular matrix proteins in the onset of Alzheimer disease. *Neurosci Lett.*, 2010; 14: 468 (3): 225-28.
- Sato y col, 2007: Sato T, Diehl TS, Narayanan S, Funamoto S, Ihara Y, De Strooper B, Steiner H, Haass C, Wolfe MS. Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem.*, 2007; 282: 33985-93.
- Savonenko y col, 2008: Savonenko AV, Melnikova T, Laird FM, Stewart KA, Price DL, Wong PC. Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2008; 105 (14): 5585-90.
- Schedin-Weiss y col, 2014: Schedin-Weiss S, Winblad B, Tjernberg LO. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J.*, 2014; 81(1): 46-62.
- Scheuner y col, 1993: Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 1993; 32: 4693-97.
- Schiffmann y col, 1997: Schiffmann SN, Bernier B, Goffinet AM. Reelin mRNA expression during mouse brain development. *Eur J Neurosci.*, 1997; 9: 1055-71.
- Selkoe, 1989: Selkoe DJ. Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.*, 1989; 12:463-90.

- Seubert y col, 1992: Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta- peptide from biological fluids. *Nature*, 1992; 359: 325-27.
- Shankar y col, 2008: Shankar GM, Li S, Mehta TH, García-Muñoz A, Shepardson NE, Smith I, Breff FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.*, 2008; 14(8): 837-42.
- Sheldon y col, 1997: Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T. *Scrambler* and *yotari* disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature*, 1997; 389: 730-33.
- Sihlbom y col, 2008: Sihlbom C, Davidsson P, Sjogren M, Wahlund LO, Nilsson CL. Structural and quantitative comparison of cerebrospinal fluid glycoproteins in Alzheimer's disease patients and healthy individuals. *Biochem Res.*, 2008; 33 (7): 1332-40.
- Silveyra y col, 2006: Silveyra MX, Cuadrado-Corrales N, Marcos A, Barquero MS, Rabano A, Calero M, Sáez-Valero J. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurochem.*, 2006; 96: 97-104.
- Smalheser y col, 2000: Smalheser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, Kriho V, Pappas GD. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000; 97: 1281-86.
- St George-Hyslop, 2000: St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.*, 2000; 47 (3): 183-99.
- Steele y col, 1990: Steele C, Rovner B, Chase GA, Folstein M. Psychiatric symptoms and nursing home placement of patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.*, 1990; 147 (8): 1049-51.
- Stolt y Bock, 2006: Stolt PC, Bock HH: Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins. *Cell signal.*, 2006; 18: 1560-71.
- Strasser y col, 2004: Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock HH, Hiesberger T, Herz J, Weeber EJ, Sweatt D, Pramatarova A, Howell B, Schneider WJ, Nimpf J. Receptor clustering is involved in reelin signaling. *Mol Cell Biol.*, 2004; 24 (3): 1378-86.
- Strittmatter y col, 1993: Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90: 1977-81.
- Sun y Soutar, 2003: Sun XM, Soutar AK. The transmembrane domain and PXXP motifs of ApoER2 exclude it from carrying out clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem.*, 2003; 278 (22): 19926-32.

- Takami y col, 2009:* Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y. Gamma-secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci.*, 2009; 29: 13042–52.
- Tam y Pasternak, 2012:* Tam JHK, Pasternak SH. Amyloid and Alzheimer's disease: Inside and out. *Can J Neurol Sci.*, 2012; 39: 286-98.
- Tanzi, 2012:* Tanzi RE. The genetics of Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012; 2: a006296.
- Tanzi y col, 2004:* Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron*, 2004; 43: 605-08.
- Tanzi y col, 1987:* Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 1987; 235 (4791): 880-84.
- Tapiola y col, 2009:* Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirittilä T. Cerebrospinal fluid β -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol.*, 2009; 66: 382–89
- Thathiah y De Strooper, 2011:* Thathiah A, De Strooper B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature Rev.*, 2011; 15: 46-49.
- Thinakaran y Koo, 2008:* Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem.*, 2008; 283 (44): 29615-9.
- Tissir y Goffinet, 2003:* Tissir F, Goffinet AM. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci.*, 2003; 4: 496–505.
- Trommsdorff y col, 1998:* Trommsdorff M, Borg JO, Margolis B, Hertz J. Interaction of cytosolic adaptor protein with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.*, 1998; 273: 33556-60.
- Trommsdorff y col 1999:* Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, 1999; 97: 689-701.
- Utsunomiya-Tate y col, 2000:* Utsunomiya-Tate N, Kubo K, Tate S, Kainosho M, Katayama E, Nakajima K, Mikoshiba K. Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody *Proc Natl Acad Sc. U S A.*, 2000; 97: 9729-34.
- Van Swieten y Spillantini, 2007:* van Swieten J, Spillantini MG. Hereditary frontotemporal dementia caused by Tau gene mutations. *Brain Pathol.*, 2007; 17(1): 63-73.

- Varvel y col, 2008: Varvel NH, Bhaskar K, Patil AR, Pimplikar SW, Herrup K, Lamb BT. Abeta oligomers induce neuronal cell cycle events in Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 2008; 28 (43): 10786-93.
- Vingtdeux y Marambaud, 2012: Vingtdeux V, Marambaud P. Identification and biology of alpha secretase. *J. Neurochem.*, 2012; 120: 34-45.
- Von Rotz y col, 2004: von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci.*, 2004; 117: 4435-48.
- Wakabayashi y De Strooper, 2008: Wakabayashi T, De Strooper B. Presenilins: members of the gamma secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiol. (Bethesda).*, 2008; 23 (4): 194-204.
- Wang y col, 2008: Wang H, Song L, Laird F, Wong PC, Lee HK. BACE1 knock-outs display deficits in activity-dependent potentiation of synaptic transmission at mossy fiber to CA3 synapsis in the hippocampus. *J Neurosci.*, 2008; 28: 8677-81.
- Ware y col, 1997: Ware ML, Fox JW, Gonzalez JL, Davis NM, Lambert de Rouvroit C, Russo CJ, Chua SC, Jr., Goffinet AM, Walsh CA. Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron*, 1997; 19: 239-49.
- Weeber y col, 2002: Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning *J Biol Chem.*, 2002; 277: 39944-52.
- Weidemann y col, 2002: Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G. A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry*, 2002; 41: 2825-35.
- Willnow, 1999: Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med (Berl).*, 1999; 77(3): 306-15
- Wirhys y col, 2001: Wirhys O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA. Reelin in plaques of beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett.*, 2001; 316: 145-48.
- Wisniewski y col, 1985: Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol.*, 1985; 17: 278-82.
- Wolfe, 2007: Wolfe MS. When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.*, 2007; 8: 136-40.

- Yankner y col, 1990*: Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta proteína: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 1990; 250: 279-82.
- Yasui y col, 2011*: Yasui N, Kitago Y, Beppu A, Kohno T, Morishita S, Gomi H, Nagae M, Hattori M, Takagi J. Functional importance of covalent homodimer of reelin protein linked via its central region. *J Biol Chem.*, 2011; 286: 35247–56.
- Younkin, 1995*: Younkin SG. Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 1995; 37: 287-88.
- Zaki y col, 2007*: Zaki M, Shehab M, El-Aleem AA, Abdel-Salam G, Koeller HB, Ilkin Y, Ross ME, Dobyns WB, Gleeson JG. Identification of a novel recessive RELN mutation using a homozygous balanced reciprocal translocation. *Am J Med Genet A.*, 2007; 143: 939-44.
- Zhang y col, 2012*: Zhang H, Ma Q, Zhang Y, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J. Neurochem.*, 2012; 120 (Suppl 1): 9-21.
- Zheng y Koo, 2011*: Zheng H, Koo EH. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener.*, 2011; 6: 27.
- Zolkiewska, 2008*: Zolkiewska A. ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. *Cell Mol Life Sci.*, 2008; 65: 2056-68.

